



COLEGIO DE POSGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
FITOPATOLOGIA**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
AISLAMIENTOS DE *Monilinia fructicola* OBTENIDOS DE
FRUTOS DE DURAZNO [*Prunus persica* (L.) Batsch] EN
MÉXICO Y PRUEBAS DE AGRESIVIDAD SOBRE
DURAZNO, PERA Y MANZANA.**

LETICIA ROBLES YERENA

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

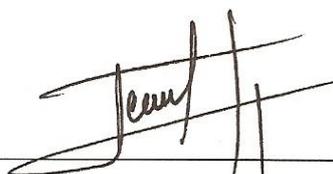
2010

La presente tesis, titulada: **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Monilinia fructicola* OBTENIDOS DE FRUTOS DE DURAZNO [*Prunus persica* (L.) Batsch] EN MÉXICO Y PRUEBAS DE AGRESIVIDAD SOBRE DURAZNO, PERA Y MANZANA**, realizada por el alumno: **Leticia Robles Yerena**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGIA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



Dr. Daniel Nieto Ángel

ASESOR:



Dr. Daniel Téliz Ortiz

ASESOR:



Dr. José Luis Domínguez Álvarez

AGRADECIMIENTOS

A Dios nuestro señor por haberme permitido concluir un objetivo más

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme el apoyo económico para concluir mis estudios de maestría.

Agradezco a todos y cada uno de los docentes e investigadores del Colegio de Postgraduados la aglomeración de conocimientos y de experiencias que compartieron conmigo durante las sesiones de clase dentro y fuera de las aulas.

Agradezco a todos los compañeros el que hubiéramos compartido grandes momentos de aprendizaje, discusión, paciencia y distracción en las aulas de trabajo, así como la gran amistad que encontré en ellos.

A los integrantes de mi Comité Académico: Al Dr. Daniel Nieto Ángel, Dr. Daniel Téliz Ortiz, Dr. José Luis Domínguez Álvarez, por el esfuerzo, la dedicación, el tiempo, el apoyo y consejos que me brindaron mismos fueron decisivos para la conclusión del trabajo de investigación.

Al Dr. Cristian Nava Díaz, Dr. Raúl Rodríguez Guerra y al Dr. Javier Hernández Morales por el gran apoyo que me brindaron.

DEDICATORIA

No cabe duda que el realizar cualquier tipo de estudios trae grandes satisfacciones, pero también limitaciones y sacrificios; por esto dedico los logros obtenidos con mucho cariño a mi familia, por su apoyo, comprensión y consejos.

A mis padres Nicolás Robles Corona y Leticia Yerena Escamilla; a mis hermanos Juan Robles Yerena, María Guadalupe Robles Yerena, Nicolás Robles Yerena y Daniel Robles Yerena; y a mi abuelo Apolinar Robles Cuevas, por el apoyo incondicional que siempre me han dado.

A Isabel Martínez de la Cruz por apoyarme y ayudarme en todos esos momentos en que uno necesita una sincera amistad. Gracias !!!

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	viii
RESUMEN GENERAL.....	1
GENERAL SUMMARY.....	2
INTRODUCCION GENERAL.....	3
OBJETIVOS.....	6
LITERATURA CITADA.....	8
CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE <i>Monilinia fructicola</i> DE DURAZNO [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch] EN MÉXICO.....	10
Resumen.....	10
Abstract.....	11
1.1. Introducción.....	12
1.2. Materiales y Métodos.....	15
1.3. Resultados y Discusión.....	23
1.4. Conclusiones.....	39
1.5. Literatura citada.....	40
CAPITULO II. AGRESIVIDAD DE <i>Monilinia fructicola in vitro</i> SOBRE DURAZNO, PERA Y MANZANA.....	44

Resumen.....	44
Abstract.....	45
2.1. Introducción.....	46
2.2. Materiales y Métodos.....	50
2.3. Resultados y Discusión.....	57
2.4. Conclusiones.....	68
2.5. Literatura citada.....	69
CONCLUSIONES GENERALES.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I		Página
Figura 1.	Sitios de origen de durazno en México de donde se aisló <i>M. fructicola</i> , 2008-2009.	13
Figura 2.	A) Pudrición café por <i>Monilinia</i> sp., en fruto de durazno B) Esporulación café típica del patógeno en la epidermis del fruto.	21
Figura 3.	A) <i>Monilinia</i> sp., cultivo monospórico de durazno en el medio cultivo AD ₂ , B) medio de cultivo MA y C) AD ₃ donde <i>Monilinia</i> tuvo un menor crecimiento a los 8 días.	24
Figura 4.	<i>M. fructicola</i> con abundante esporulación y anillos de crecimiento en medio de cultivo AD ₂ A) y en PDA B), a los 8 días después de la siembra.	26
Figura 5.	Evaluación de los 50 cultivos monospóricos de <i>Monilinia</i> sp. en los medios PDA y AD ₂ (agar-durazno) a los 2 días de crecimiento 2009.	27
Figura 6.	Evaluación de los 50 cultivos monospóricos de <i>Monilinia</i> sp. obtenidos de durazno en los medios PDA y AD ₂ a los 6 días de crecimiento, 2009.	28
Figura 7.	A) Crecimiento característico anillado de <i>Monilinia fructicola</i> aislado de durazno, B) agrupación de esporodoquios C) formación de cadenas de conidios D) conidios hialinos, limoniformes, cortos, unicelulares de fruto inoculado y D1) de medio AD ₂ , E) presencia de hifas septadas, hialinas y bifurcadas y F) microconidios (espermacios) circulares sobre conidióforo en forma de botella.	33
Figura 8.	Dendograma de la caracterización morfológica de los 50 cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> , aislados de durazno de cinco entidades de México, 2009.	35
Figura 9.	Producto de PCR obtenido mediante la amplificación con iniciadores universales para <i>Monilinia</i> sp. M: marcador de 100 pares de bases.	36
Figura 10.	Dendograma obtenido de las secuencias de 45 cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> de durazno de cinco entidades de México, comparadas con las especies <i>M. polystroma</i> , <i>M. fructigena</i> y <i>M. laxa</i> que son las tres del extremo izquierdo, 2009.	38

CAPITULO II	Página
Figura 1. Sitios de origen de durazno en México de donde se aisló <i>M. fructicola</i> , 2008-2009.	50
Figura 2. A) Inoculación de frutos de durazno variedad Diamante con <i>M. fructicola</i> , B) colocación de frutos en cámara húmeda, C) evaluación de síntomas en frutos inoculados y D) medición del diámetro de lesión, 2009.	55
Figura 3. Inoculación de <i>M. fructicola</i> en pera variedad Mantequilla A) y manzana variedad Golden B), 2009.	56
Figura 4. A) Frutos de durazno inoculados con <i>M. fructicola</i> mostrando abundante esporulación café concéntrica y necrosis de la epidermis B) moderada esporulación y sin necrosis de la epidermis, a los 10 días después de la inoculación, 2009.	57
Figura 5. Agresividad de los cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> inoculados sobre frutos de durazno variedad Diamante a los 2 y 5 días después de la inoculación, 2009. Destacan el MoMo4 por su rápido crecimiento y el MoMi2 por su lento crecimiento a los 5 ddi.	60
Figura 6. Grado de agresividad de 50 cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> obtenidos de frutos de durazno provenientes de los Estados de Chihuahua (MoC), Morelos (MoMo), Aguascalientes (MoA), Michoacán (MoMi), Zacatecas (MoZ) a los 2 días después de la inoculación sobre frutos de durazno, 2009.	61
Figura 7. A) Abundante esporulación café, concéntrica y necrosis de la epidermis en pera inoculada con <i>M. fructicola</i> y B) esporodoquios distribuidos aleatoriamente y necrosis en manzana, a los 10 días después de la inoculación, 2009.	63
Figura 8. Agresividad acumulada de cinco cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> provenientes de cinco Estados Morelos (MoMo), Michoacán (MoMi), Chihuahua (MoC), Zacatecas (MoZ) y Aguascalientes (MoA,) inoculados en frutos de manzana del día 2 al día 8 después de la inoculación, evaluada con base en el Área bajo la curva de los diámetros de lesión.	66

INDICE DE TABLAS

CAPITULO I		Página.
Tabla 1.	Cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> , clave asignada, especie identificada, cultivar afectado, procedencia de la muestra, y fecha de aislamiento, 2008-2009.	18
Tabla 2.	Crecimiento de <i>Monilinia</i> sp. en 8 medios de cultivo a los 8 días de la siembra.	24
Tabla 3.	Características morfológicas de 50 cultivos monospóricos de <i>Monilinia</i> sp. aisladas de durazno, procedentes de cinco Estados de México, observadas a los 7 días de crecimiento en PDA y AD ₂ , diámetro de las colonias a los 2 y 6 días y dimensión de los conidios a los 12 días, 2009.	25
Tabla 4.	Comparación del crecimiento en centímetros de los cultivos monospóricos de <i>Monilinia</i> sp. de los cinco Estados en PDA y AD ₂ a los 2 y 6 días de la siembra.	29
Tabla 5.	Comparación del crecimiento en centímetros de los cultivos monospóricos de <i>Monilinia</i> sp. en PDA y AD ₂ a los 2 y 6 días de la siembra.	29
Tabla 6.	Comparación del crecimiento en centímetros de colonias de <i>Monilinia laxa</i> y <i>M. fructigena</i> evaluados a los 4 y 7 días (Muños <i>et al.</i> , 2008) y a los 6 días en la presente investigación con 50 cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> , 2009.	30
CAPITULO II		Página.
Tabla 1.	Cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> , clave asignada, especie identificada, cultivar afectado, procedencia de la muestra, y fecha de aislamiento, 2008-2009.	51
Tabla 2.	Características morfológicas de 50 cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> inoculados en frutos de durazno a los 11 días y diámetro de lesiones evaluadas a los 2 y 5 días después de la inoculación, 2009.	58

Tabla 3.	Diámetros de lesión causados en frutos de durazno por los cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> provenientes de cinco Estados a los 2 y 5 días después de la inoculación.	62
Tabla 4.	Diámetros de lesión en unidades bajo la curva de crecimiento (UBC) obtenidos de la inoculación de cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> provenientes de cinco Estados sobre frutos de pera y manzana a los 8 días de la inoculación.	64
Tabla 5.	Agresividad de cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> y su relación con días de incubación sobre frutos inoculados de pera y manzana.	65
Tabla 6.	Crecimiento acumulado de cinco cultivos monospóricos de <i>M. fructicola</i> provenientes de cinco Estados (Morelos, Michoacán, Chihuahua, Zacatecas, Aguascalientes) inoculados en frutos de pera y manzana en 6 periodos de incubación del día 2 (D2) al día 8 (D8) después de la inoculación, evaluado con base en el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de los diámetros de la lesión.	66

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Monilinia fructicola* OBTENIDOS DE FRUTOS DE DURAZNO [*Prunus persica* (L.) Batsch] EN MÉXICO Y PRUEBAS DE AGRESIVIDAD SOBRE DURAZNO, PERA Y MANZANA.

Leticia Robles Yerena, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010.

Existen tres especies de *Monilinia* reportadas como causantes de la pudrición café de los frutos de hueso: *M. fructigena* y *M. laxa* de origen Europeo y *M. fructicola* de origen Americano. En este trabajo 50 cultivos monospóricos de *Monilinia* spp. de frutos de durazno provenientes de los Estados de Aguascalientes, Chihuahua, Michoacán, Morelos y Zacatecas, México colectados durante el 2008-2009. La caracterización molecular se hizo mediante PCR e ITS y se confirmó a *Monilinia fructicola* con base en la banda de 500 pb y la amplificación de la región interna ITS-1 e ITS-2. Para la caracterización morfológica PDA y agar-durazno (AD₂) fueron seleccionados. Las colonias fueron color gris marrón, de crecimiento continuo uniforme y los márgenes de las colonias fueron lobulados, formaron abundantes masas estromáticas y desarrollaron círculos de crecimiento. Los conidios midieron en un rango de 22.96 – 27.34 µm por 15.66 - 18.59 µm. La agresividad de los 50 cultivos monospóricos se midió con base en diámetro de las lesiones desarrolladas en frutos de durazno variedad Diamante, desde los dos hasta los cinco días después de la inoculación (ddi). Un cultivo monospórico representativo de cada Estado fue probado para la patogenicidad en frutos de manzana variedad Golden y en pera variedad Mantequilla. La esporulación y la necrosis gradual de la epidermis fue similar en los tres frutos con cada cultivo monospórico. Anillos concéntricos de masas de esporodoquios se desarrollaron en durazno y pera; masas de esporodoquios en manzana tuvieron un crecimiento aleatorio, no concéntrico. Los cultivos monospóricos mostraron diferencias significativas ($P=0.05$) en agresividad en los tres frutos. Los 50 cultivos monospóricos se caracterizaron como *M. fructicola*; no se observó la presencia de otra especie de *Monilinia*.

Palabras clave: *Monilinia fructigena*, pudrición café, postcosecha, medios de cultivo, PCR.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION ISOLATES OF *Monilinia fructicola* OBTAINED FROM FRUITS OF PEACH [*Prunus persica* (L.) Batsch] IN MEXICO AND TESTING OF AGGRESSION ON PEACH, PEAR AND APPLE.

Leticia Robles Yerena, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010.

Three species of *Monilinia* have been reported as causal agents of brown rot of stone fruits: *M. fructigena* and *M. laxa*, of European origin, and *M. fructicola*, of American origin. In this study, 50 *Monilinia* spp. monosporic cultures obtained from peach fruits originating in the States of Aguascalientes, Chihuahua, Michoacán, Morelos and Zacatecas, Mexico were selected during 2008-2009. The molecular characterization was carried out through PCR and ITS and *Monilinia fructicola* was confirmed based on a 500 bp band obtained with species-specific primers and on the amplification of internal regions ITS1 and ITS2. For the morphological characterization PDA and peach-agar (PA₂) were selected for use out of 8 culture media. The colonies on PDA were grey-brown, of uniform and continuous growth, with undulated edges. They formed abundant stromatic masses and developed growth rings. The conidia size ranged from 22.96 – 27.34 µm per 15.66 - 18.59 µm. The aggressiveness of the 50 monosporic cultures was determined based on the diameter of lesions developed on peach fruits variety Diamante ages two to five days after inoculation. A representative monosporic culture from each state was tested for pathogenicity on apple fruits variety Golden and pear fruits variety Mantequilla. The sporulation and the gradual necrosis of epidermis were similar on the three fruits for each monosporic culture. Concentric rings of masses sporodochia developed on peach and pear, while on apple the masses sporodochia had a random growth. The isolates showed significant differences on aggressiveness ($P=0.05$) to the three fruits. The 50 monosporic cultures were characterized as *M. fructicola*; the presence of another species of *Monilinia* was not observed.

Key words: *Monilinia fructigena*, brown rot, postharvest, media cultures, PCR.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El duraznero, [*Prunus persica* L. Batsch], es originario de china donde se cultiva desde hace 3,000 años. Los duraznos fueron traídos probablemente a Persia a través de las rutas comerciales por las montañas, llegó a ser conocido como fruta pérsica, de ahí el nombre *pérsica*, esto llevo al error de que los melocotones eran originarios de Persia (Ogawa *et al.*, 1999). Durante la conquista, los españoles trajeron semillas de este frutal a México, de donde se dispersó a Florida y California (Aceves, 1983). Juscafresca (1978), Vidal (1979) y Tamaro (1979) mencionan que el durazno es originario de China en donde se cultivo en épocas remotas; en China este es venerado, se considera el árbol del bien y del mal; es muy cultivado pero sus frutos son de mala calidad.

Rodríguez y Pérez (1980) indican que el durazno fue introducido por los árabes, del Norte de África a España; de aquí los españoles lo introdujeron a América. En México, en el siglo XV se extendió en los lugares más recónditos que presentaban posibilidad de adaptación; después de sucesivas generaciones, se origino una amplia gama de fenotipos que persisten hasta la actualidad.

De acuerdo con Rodríguez y Pérez (1980) y Demenech (1981), el durazno (*Prunus pérsica* L. Bats.) pertenece al Reino Vegetal, División Tracheophyta, Subdivisión Angiospermae, Clase Dicotiledoneae, Subclase Cloripetalas, Orden Rosales y Familia Rosaceae.

Al durazno se le denomina también bresquilla, prisco, albérchigo, alporche, prescal, nectria y melocotón (Juscafresca, 1978). El durazno es un frutal que tienen gran importancia en la economía del país, debido a la extensión cosechada y volumen de producción (40,252.84 ha y 190,960.64 ton SIACON 2008) y su demanda en el

mercado, está ampliamente difundido en las regiones templadas de México. El fruto tiene amplia aceptación en el mercado y es complemento alimenticio de gran utilidad, porque contiene calcio, proteínas, azúcares y vitaminas A, B y C (Aceves, 1983; Manzanares, 1993 y SIACON, 2008).

Los principales países productores de durazno, en orden de importancia, son Estados Unidos, Italia y Francia. En México destacan por sus volúmenes de cosecha, se cultiva en 26 estados del país, siendo sus principales productores: Zacatecas, Michoacán, Puebla, Morelos, Chihuahua, Tlaxcala, Aguascalientes, Guanajuato, México, Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Guerrero y Sonora (Aceves, 1983). Las principales regiones donde se cultiva el durazno es en la región Centro, Centro Occidente, NorEste y NorOeste (SIACON, 2008).

Entre los principales problemas que afectan la producción del duraznero, se encuentran diversas plagas y enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus. Las enfermedades del duraznero más comúnmente observadas en México debido a condiciones climáticas que favorecen la incidencia de enfermedades fungosas aéreas son: la verrucosis (*Thaprina deformans* Berk. y Tul.), tiro de munición (*Coryneum beijerinckii* Lev, y Janch.), cenicilla (*Sphaeroteca panosa* Wally. y Lev.) y la pudrición café (*Monilinia* spp. Wint.), las cuales atacan ramas, hojas, flores y frutos de los árboles en sus diferentes etapas fonológicas y provocan daños severos que afectan significativamente la producción y calidad del durazno (Manzanares, 1993).

El organismo causal es *Monilinia* spp, un hongo superior perteneciente a la Familia Sclerotiniaceae, Orden Heliotales, Serie Discomycetes, Subclase Euascomycetidae,

Clase Ascomycete, Subdivisión Eumycotina y Division Mycota. Produce dos tipos de esporas: ascosporas de origen sexual, contenidas en ascas en cuerpos fructíferos denominados apotecios y conidios en cadenas en esporodoquios, de origen asexual (Manzanares, 1993 y Mondito, 2002).

La pudrición café, parda, marrón, morena o momificado de los frutos es causada por *Monilinia* spp. enfermedad de hongos más importante y destructiva de las frutas de hueso (*Prunus* spp.). Su importancia radica en el ataque a flores, brotes y frutos ocasionando la decadencia de los mismos. Es una enfermedad de difícil control cuando ocurren condiciones favorables a su desarrollo. Los cultivares utilizados son susceptibles a la misma y las condiciones climáticas de nuestro país favorecen su desarrollo en primavera a través de las ascosporas y conidios producidos en las momias infectadas (Holtz *et al.*, 1998 y Luo *et al.*, 2001). Desarrollan conidios a partir de flores infectadas, los cuales producen infecciones latentes secundarias en los frutos jóvenes (Luo y Michailides, 2001). Estos frutos pueden ser retirados o caerse naturalmente y mantenerse en el huerto donde puede producirse numerosos conidios cuando la humedad es alta (Hong *et al.*, 1997 y Luo *et al.* 2001). Cuando se producen condiciones favorables, el potencial del inoculo en los huertos, es un factor importante que afecta la flor y provoca infecciones latentes que pueden dar lugar a la pudrición de la fruta causando importantes pérdidas en pre y post-cosecha (Luo y Michailides, 2001 y Ma *et al.*, 2003).

La identificación de estas especies con base en las características morfológicas en medios de cultivo es imprecisa pues hay variación entre los aislados de una misma especie. Las técnicas moleculares basadas en el análisis del ADN son muy

específicas y sensibles. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha desarrollado para detectar, identificar y clasificar patógenos de plantas, especies de *Monilinia* se han identificado con técnicas moleculares (Martin *et al.*, 2000; Hughes *et al.*, 2000).

En México son escasos los trabajos dirigidos al estudio de las características morfológicas, fisiológicas y moleculares de las poblaciones de *Monilinia* spp. que ocurren en durazno. Por lo anterior, la presente investigación se enfocó a evaluar estas características. Este tipo de información debe ayudar a entender el impacto de las medidas de control y permitir el desarrollo de nuevas y mejores estrategias para combatir la pudrición café del durazno. Por tal motivo, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivos

- Determinar la etiología de la pudrición café del durazno en México.
- Determinar la variación morfológica y molecular del agente causal de la pudrición café del durazno en México
- Evaluar la agresividad de los cultivos monospóricos de la pudrición café de los cinco Estados en frutos de durazno variedad Diamante, pera variedad Mantequilla y manzana variedad Golden.
- Determinar la identidad y variación molecular del agente causal de la pudrición café

Hipótesis

- Cultivos monospóricos de los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Michoacán, Morelos y Zacatecas pueden variar a nivel morfológico, agresivamente y molecularmente.

LITERATURA CITADA

- Demenech, J.M.T. 1981. Atlas de botánica. 25ª edición. Ediciones Jover. Barcelona, España.
- Holtz, B. A., Michailides, T. J., and Hong C. X. 1998. Development of apothecia from stone fruit infected and stromatized by *Monilinia fructicola* in California. Plant Dis. 82: 1375–1380.
- Hong, C. X., Holtz, B. A., Morgan, D. P., and Michailides, T. J. 1997. Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculums of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. Plant Dis. 81: 519–524.
- Hughes, K.J.D., Fulton, C.E., McReynolds, D. and Lane, C.R. 2000. Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 30, 507-511.
- Ogawa, J. M., Zehr, E. I., George, W. B., Ritchie, F. D., Kiyoto, U., y Uyemoto, J.K. 1999. Plagas y enfermedades de los frutales de hueso. La Sociedad Americana de Fitopatología. 105p.
- Juscafresca, B.1978. Árboles frutales, Cultivo y Explotación Comercial. 7a. ed. Edit. ADEOS. Barcelona, España. 381p.
- Luo, Y., and Michailides, T. J. 2001. Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. Phytopathology 91: 864–872.
- Luo, Y., Ma, Z., and Michailides T. J. 2001. Analysis of factors affecting latent infection and sporulation of *Monilinia fructicola* on prune fruit. Plant Dis. 85: 999–1003.
- Luo, Y., Morgan, D. P., and Michailides, T. J. 2001. Risk analysis of brown rot blossom blight of prune caused by *Monilinia fructicola*. Phytopathology 91: 759–768.
- Ma, Z., Luo, Y., and Michailides, T. J. 2003. Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. Plant Pathol. 151: 312–322.
- Manzanares, M. R. 1993. Control químico de la cenicilla (*Sphaeroteca pannosa* Wal Lev.) y de la pudrición morena (*Monilinia fructicola* Wint Honey) del durazno. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Centro de Estudios Profesionales. Tesis. Cocula Guerrero. 72p
- Martin, R. R., James, D., and Levesque, C. A. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies of plant disease management. Annu. Rev. Phytopathol. 38: 207-239.

Rodríguez, Ch. J., y Pérez, G.G. 1980. Delegación Regional de Fruticultura Zona Centro. CONAFRUT. SARH.

Tamaro, D. 1979. Fruticultura. 4a edición. Ed. Gustavo Gill. Barcelona, España. 939p.

Vidal. J. 1979. Fruticultura moderna. 1a. ed. Edit. Buenos Aires. Albatros. 309 p.

CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Monilinia fructicola* DE DURAZNO [*Prunus persica* (L.) Batsch] EN MÉXICO.

**Leticia Robles Yerena, MC.
Colegio de Postgraduados, 2010.**

La pudrición café de los frutos de hueso es causada por varias especies de el género *Monilinia*. La enfermedad limita hasta en un 100 % la producción y la calidad de frutos en campo y en postcosecha. Existen tres especies reportadas del género *Monilinia* muy relacionadas entre sí: *M. fructigena* y *M. laxa* de origen Europeo y *M. fructicola* de origen Americano. En el presente trabajo se seleccionaron 50 cultivos monospóricos de *Monilinia* aislados de frutos de durazno, 10 aislados para cada uno de los Estados de Aguascalientes, Chihuahua, Michoacán, Morelos y Zacatecas durante el 2008-2009. Para la caracterización morfológica se seleccionaron, de ocho medios de cultivo, PDA y agar-durazno (AD₂). Se evaluó la producción de masas estromáticas, la coloración de la colonia, la forma de los márgenes y la presencia de anillos concéntricos a los 7 días después de la incubación (ddi) y a los 12 ddi se evaluó 50 conidios por cultivo monospórico para cada uno de los cinco Estados que se evaluaron. Los mejores medios de cultivo de los ocho probados para el rápido crecimiento de *Monilinia* spp a los 8 ddi fueron PCA, AD_{1 y 2}. Todos los 50 cultivos monospóricos de *Monilinia* spp crecieron más rápido en AD₂, independientemente de la entidad de donde se aislaron. PDA sirvió para evaluar las características morfológicas. Las colonias fueron color gris marrón, de crecimiento uniforme y continuo, los márgenes de las colonias lobulados, formaron abundantes masas estromáticas y desarrollaron círculos de crecimiento en PDA y AD₂. Los conidios midieron 23 - 27.3 x 15.7 - 18.6 µm. La PCR confirmó la especie de *Monilinia fructicola* con base en la banda de 500 pb y la amplificación de la región interna del genoma ITS (ITS-1 e ITS-2). Todos los cultivos monospóricos en el presente trabajo se identificaron molecularmente como *M. fructicola*; otras especies de *Monilinia* no fueron identificadas.

Palabras clave: *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, pudrición café, *Prunus persica*, medio de cultivo, morfología, PCR.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Monilinia fructicola* FROM PEACHES [*Prunus persica* (L.) Batsch] IN MEXICO

**Leticia RoblesYerena, M.Sc.
Colegio de Postgraduados, 2010.**

Brown rot of stone fruits is caused by various species of the genus *Monilinia*. This disease limits up to 100% of the production and quality of the fruits in the field and after harvest. There are three reported species of the genus *Monilinia* which are closely related: *M. fructigena* and *M. laxa*, originally from Europe, and *M. fructicola* from America. For this research work, 50 monosporic cultures of *Monilinia* were isolated from peach fruits, 10 isolates from each of the states of Aguascalientes, Chihuahua, Michoacan, Morelos, and Zacatecas during 2008 and 2009. PDA and peach - agar (PA₂) were selected from eight culture media for morphological characterization. The variables evaluated were: stroma mass production, colony color, the shape of the margins, and the presence of concentric rings at 7 days after incubation (dai). At 12 dai 50 conidia per monosporic culture from each of the five states were measured. The best culture media, out of eight tested, for quick growth of *Molinilia* spp at eight dai were PDA, PA₁ and PA₂. All 50 monosporic cultures of *Monilinia* spp grew faster in PA₂, independently from the state from which they were isolated. PDA was used to evaluate the morphological characteristics. The colonies were gray-brown, with uniform and continuous growth, their margins were lobulated, they formed abundant stroma masses, and developed growth circles both in PDA and PA₂. Conidia measured 23-27.3 x 15.7 66-18.6 µm. PCR confirmed the species as *Monilinia fructicola* based on the 500 pb band, and the amplification of the internal region of the ITS genome (ITS-1 and ITS-2). All the monosporic cultures in this work were molecularly identified as *M. fructicola*; no other species of *Monilinia* was identified.

Key words: *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, brown rot, *Prunus persica* culture medium, morphology, PCR.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de durazno [*Prunus persica* (L.) Bats.] está ampliamente distribuido en las regiones templadas de México. El fruto tiene amplia aceptación en el mercado y es complemento alimenticio de gran calidad, porque contiene calcio, proteínas, azúcares y vitaminas A, B y C. Diversos factores limitan y reducen la producción de durazno en el mundo, las enfermedades fungosas importantes son: la verrucosis (*Thaprina deformans* Berk y Tul.), el tiro de munición (*Coryneum beijerinckii* Lev y Janch.), la cenicilla (*Sphaeroteca pannosa* Wally y Lev) y la pudrición café (*Monilinia* spp. Wint.), las cuales atacan las ramas, hojas, flores y frutos y pueden afectar significativamente la producción y la calidad del durazno (Manzanares, 1993 y Guang *et al.*, 2002). La pudrición café, como nos referiremos en este estudio, producida por *Monilinia* spp., puede ocasionar pérdidas importantes de producción en diversas especies de rosáceas: *Prunus* spp., durazno [*Prunus pérsica* L.], manzano [*Pyrus malus* L.] y peral [*Pyrus communis* L.]. Tres especies de *Monilinia* spp. se han identificado: *M. laxa* (Aderhold & Ruhland) Honey, *M. fructigena* (Aderhold & Ruhland) Honey y *M. fructicola* (Winter) Honey y un anamorfo, *Monilia polystroma* van Leeuwen (Visarathanonth *et al.*, 1988, Fulton y Brown, 1997, Agrios, 2002 y Muños *et al.*, 2008). Las especies *M. laxa* y *M. fructigena*, de origen europeo, consideradas del Viejo Mundo presentan distribución mundial (Batra, 1991), pero *M. fructicola*, de origen americano (Muños *et al.*, 2008). Por otro lado Fulton y Brown (1997) menciona que *M. fructicola* se presenta en el América, Sudáfrica y Australasia; no está presente en Europa en donde está clasificado como un patógeno de cuarentena. *M. fructicola* ha desarrollado resistencia de campo a fungicidas en EE. UU, cuenta con capacidad de adaptación y variabilidad,

posiblemente se explique para una mayor frecuencia de la fase sexual. *Monilinia polystroma* sólo se ha encontrado en Japón. En América del Norte la pudrición parda se debe principalmente a *M. fructicola* y en menor medida a *M. laxa* (Van Leeuwen *et al.*, 2002).

Los principales hospederos de *M. fructicola* son melocotón (*Prunus persica* [L.] Batsch), nectarina (*Prunus persica* var. *nectarina* [Aiton] Maxim.), albaricoque (*Prunus armeniaca* L.) y ciruela (*Prunus domestica* L.). *M. fructigena* es más frecuente en manzanas (*Pyrus malus* L.), peras (*Pyrus communis* L.) y cerezas (*Prunus avium* L.) (Batra, 1991).

M. laxa prefiere albaricoques, almendros (*Prunus dulcis* [Mill.] D.A. Webb) y cerezos. y *M. polystroma* infecta manzano, peral y membrillo (*Cydonia oblonga* Mill.).

M. laxa afecta preferentemente flores y ramillas mientras que *M. fructigena* tiene mayor incidencia en frutos (Byrde y Willetts, 1977 y Muños *et al.*, 2008). *M. fructicola* es un patógeno de frutales de hueso capaz de atacar flores, frutos y ramas (Ogawa y English, 1960, Ogawa *et al.*, 1999 y Malvárez *et al.*, 2001). Es difícil identificar a estas especies con base en las características morfológicas y en la tasa de crecimiento micelial en medios de cultivo, pueden variar entre los aislados de una misma especie. Las técnicas moleculares basadas en el análisis del ADN, son muy útiles porque son altamente específicos y sensibles. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha desarrollado para detectar, identificar y clasificar patógenos de plantas (Martin *et al.*, 2000 y Hughes *et al.* 2000). Se han utilizado Amplificación al Azar de la DNA Polimórfico. (RAPD) (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), Amplificación de la Longitud del Fragmento Polimórfico (AFLP) (Majer *et al.*, 1996), amplificación de la región ITS y digestión posterior con enzimas de restricción (Snyder y Jones, 1999; Förster y Adaskaveg, 2000) y otros tipos de marcadores

moleculares, basados en pequeñas variaciones intraespecíficas y un bajo polimorfismo interespecífico en la región ITS. Loos y Frey (2000) desarrollaron parejas de iniciadores específicos para cada especie. Fulton y Brown (1997), Förster y Adaskaveg, (2000), Boehm *et al.* (2001) diseñaron iniciadores específicos para *M. fructicola*. Fulton y Brown (1997) identificaron un intrón del grupo-I en la (subunidad pequeña) SSU del rDNA de *M. fructicola* el cual no está presente en *M. fructigena* y *M. laxa*. Côté *et al.* (2004) observaron que el producto de la PCR que contiene el intrón no se amplifica en algunos aislados de *M. fructicola*, lo cual indica variabilidad genética entre los aislados de dicha especie. Se han desarrollado iniciadores que permiten la diferenciación inequívoca de *M. laxa*, *M. fructigena* y *M. fructicola* en una única reacción de PCR (Malvárez *et al.*, 2001 y Côté *et al.*, 2004), lo cual agiliza la detección de estas especies. Estas técnicas han sido utilizadas para diferenciar *Monilinia fructicola* de otras especies (Ma *et al.*, 2003). Los objetivos del presente trabajo fueron identificar la o las especies de *Monilinia* que atacan al durazno en México, ya que existe un estudio en Tlaxcala, México por Santiago *et al.*, (2008). Por ello los cultivos monospóricos obtenidos a partir de frutos infectados serán caracterizados por medio de la técnica de PCR e ITS con iniciadores universales que usados en una única reacción permitirán distinguir la especie dependiendo del tamaño del producto de amplificación obtenido, esto nos ayudara a determinar la especie presente en México.

MATERIALES Y METODOS

En el año 2008-09 se colectaron en la central de Iztapalapa México frutos de durazno, de diversos cultivares, provenientes de Aguascalientes, Chihuahua, Michoacán, Morelos y Zacatecas (Fig.1). Una caja de cada Estado con aproximadamente 250 frutos se observó en el laboratorio y se separaron los primeros 10 frutos con síntomas y signos de la pudrición café, de donde se hicieron aislamientos y cultivos monospóricos.



Figura 1. Sitios de origen de durazno en México de donde se aisló *M. fructicola*, 2008-2009.

Identificación del patógeno

De los frutos de durazno con síntoma y signos de la pudrición café, considerados de las cajas por estado se dejaron en observación. De los cuales se considero el desarrollo y crecimiento del cuerpo fructífero característico de *Monilinia* spp. en microscopio electrónico y estereoscópico.

Identificación de un medio de cultivo selectivo para *Monilinia* spp.

En cajas de Petri de 90 x 15 mm, ocho medios de cultivo se probaron para obtener uno que favoreciera a *Monilinia* spp. Los medios de cultivo fueron: 1) Agar-durazno (AD₁, 200 gr de durazno licuado, 20 gr de Agar-Agar en 1000 mL de agua destilada estéril), 2) Agar-durazno (AD₂, igual que el anterior pero los 200 gr de durazno en cuadros), 3) Agar-durazno (AD₃, igual que el anterior pero con solo 20 gr de durazno en cuadros), 4) Papa-Dextrosa-Agar Bioxon (PDA, 39 g L⁻¹ en 1000 mL), 5) PDA natural (PDAN, 200 gr papa, 15 gr Dextrosa y 20 gr Agar-Agar en 1000 mL de agua), 6) Agar Malta Acidificado (AMA, 2 % Extracto de Malta, 33.6 gr en 1000 mL de agua), 7) Papa-Zanahoria-Agar (PCA₁, 200 gr de papa, 200 gr de zanahoria y 18 gr de Agar-Agar en 1000 mL de agua) 8) Papa-Zanahoria-Agar (PCA₂, 20 gr de papa, 20 gr de zanahoria y 18 gr de Agar-Agar en 1000 mL de agua).

Fragmentos de *Monilinia* de 5 mm de diámetro obtenidos del margen de la colonia sobre PDA del aislamiento MoMo10 del estado de Morelos, fueron colocados en el centro de cuatro cajas de Petri de los diferentes medios de cultivo, las placas se incubaron a temperatura ambiente 23 ± 1 °C y se evaluaron cada 24 h, por 8 días.

La diferencia entre los diámetros medios de la colonia del aislado de *Monilinia* spp. en los ocho medios, se evaluó mediante un análisis de la varianza y una prueba de Tukey $P=0.05$ a los 8 días de incubación, utilizando el programa SAS System Windows Versión 9.0, 2002.

Aislamiento del patógeno

Fragmentos de tejido enfermo o una suspensión de conidios de frutos con síntomas y signos de la pudrición café se colocaron en medio de cultivo Agar-durazno (AD₂).

Fragmentos de frutos de durazno de los estados de Morelos y Michoacán con síntomas de pudrición café se desinfestaron por inmersión con hipoclorito de sodio al 1 % durante un minuto, seguidamente de dos pasos en agua destilada estéril, se retiró la humedad de los fragmentos y se sembraron 4 piezas en cajas de Petri con Agar-Durazno (AD₂, 200 gr durazno, 20 gr Agar en 1000 mL agua destilada). Cuando los aislados esporularon, se realizó una suspensión de conidios con agua destilada estéril en AD₂. Las cajas se incubaron durante 48 h a 23 ± 1 °C. Las colonias fungosas predominantes fueron transferidas a nuevas cajas con AD₂ y se purificaron mediante cultivos monospóricos para realizar pruebas de patogenicidad e identificación molecular. Los cultivos monospóricos fueron conservados en aceite mineral, tiras de papel y en cajas de Petri con medio AD₂.

Diez cultivos monospóricos se conservaron de cada uno de los cinco Estados (Tabla 1).

Tabla 1. Cultivos monospóricos de *M. fructicola*, clave asignada, especie identificada, cultivar afectado, procedencia de la muestra, y fecha de aislamiento, 2008-2009.

Cultivos monospóricos^z	Cultivar durazno	Localidad	Fecha aislamiento
MoMo1	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo2	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo3	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo4	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo5	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo6	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo7	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo8	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo9	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo10	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMi1	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi2	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi3	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi4	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi5	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi6	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi7	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi8	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi9	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi10	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoC1	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC2	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC3	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC4	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC5	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC6	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC7	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC8	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC9	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC10	Prisco	Chihuahua	02/08/08
MoA1	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA2	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA3	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA4	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA5	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA6	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA7	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA8	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA9	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA10	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoZ1	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ2	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ3	Criollo	Zacatecas	26/08/08

MoZ4	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ5	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ6	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ7	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ8	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ9	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ10	Criollo	Zacatecas	26/08/08

^zMoMo *Monilinia* aislado de Morelos, MoMi *Monilinia* de Michoacán, MoC *Monilinia* de Chihuahua, MoA *Monilinia* de Aguascalientes y MoZ *Monilinia* de Zacatecas.

Caracterización morfológica

Discos de 5 mm de diámetro obtenidos del margen de colonias de *Monilinia* spp. de 7 días de crecimiento en medio de cultivo AD₂, fueron transferidos en tres cajas de Petri con PDA y tres con AD₂ que se incubaron 23 ± 1 °C. El diámetro de crecimiento de la colonia del hongo se midió cada 24 h hasta los 6 días de incubación. Las características morfológicas evaluadas a los 7 días después de la incubación (ddi) fueron: 1) forma de los márgenes de la colonia, 2) presencia de masas estromáticas de esporodoquios, 3) formación de anillos concéntricos de crecimiento y 4) coloración de la colonia. La medición de 50 conidios por cultivo monospórico de cada Estado se realizó utilizando el programa MotiC plus, versión 2.

Los valores del diámetro de crecimiento de las colonias a los 2 y 6 días después de la incubación fueron sometidos a un análisis de varianza y las medias obtenidas fueron analizadas en una prueba de Tukey al (p≤0.05). Se utilizó el programa SAS System Windows Versión 9.0, 2002.

Caracterización molecular

El DNA de cada uno de los 50 cultivos monospóricos se aisló con el DNeasy® Mini Kit (QUIAGEN).

Protocolo de extracción del ADN (Mini Kit).

De cada cultivo monospórico con crecimiento micelial se tomó una muestra de *Monilinia* spp., se transfirió a un tubo eppendorf, se maceró con una aguja de cristal, se adicionó 400 µL de Buffer AP1 y 4 µL RNasa, se agitó ligeramente, luego las muestras fueron incubadas en baño María por 10 min a 65 °C, se hizo una agitación por inversión aproximadamente cada 2 min. Posteriormente se adicionó a la muestra 130 µL del Buffer AP2, y se incubó por 5 min en hielo. La mezcla se colocó en la columna QIAshredder Mini spin lila y se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm. Se retiró el sobrenadante para colocarlo en un nuevo tubo eppendorf, al que se le adicionó 675 µL del Buffer AP3/E. La mezcla fue colocada en un tubo DNeasy Mini spin, sometidos a centrifugación por 1 min a 8 000 rpm. En seguida la columna fue reemplazada por otra suplementaria del protocolo, se agregó 500 µL del Buffer AW en la membrana del Mini spin DNeasy y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm. Nuevamente se cambió la columna con el filtrado, se le adicionó a la membrana 500 µL del Buffer AW y se centrifugó por 2 min a 14, 000 rpm, con el propósito de lavar al ADN. Finalmente, se transfirió la columna DNeasy Mini spin a un tubo eppendorf, directamente en la membrana se le adicionó 100 µL del Buffer AE del DNeasy, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm (QUIAGEN, 2006). Las muestras fueron conservadas en refrigeración hasta su uso.

Amplificación del ADN mediante PCR

Los cultivos fueron identificados utilizando con una PCR usando iniciadores universales de las regiones internas ITS1 e ITS2, ubicadas en los genes ribosomales (rDNA) localizadas entre la subunidad pequeña 18S - 5.8S y la subunidad larga 5.8S - 28S, que fueron amplificadas con la combinación de iniciadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). La amplificación se realizó de acuerdo a los protocolos de Ahrens y Seemüller (1992) con la siguiente combinación de agua estéril ionizada (12.145 µL), solución amortiguadora TBE 1X (4 µL), MgCl₂ a 1.5 mM (2.75 µL), dNTP's a 0.2 mM (1.375 µL), Taq DNA-polimerasa 1.5 unidades (0.33 µL), iniciadores ITS4 e ITS5 a 10 pM (2 µL) por cada uno y muestra de ADN a una concentración de 20 ng (1 µL). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min por 30 ciclos, alineamiento y extensión a 95 °C por 1 min, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 10 min (While *et al.*, 1990). El producto se purificó con el método y reactivos de QIAquick para PCR.

El producto de PCR se secuenció en la empresa MACROGEN (Taiwan). Las secuencias fueron comparadas usando la herramienta blast en NCBI. La mayor similitud de las secuencias del banco fueron utilizados para la identificación. Las secuencias obtenidas de los cultivos monospóricos estaban alineados. Las secuencias se compararon por UPGMA con bootstrap 1000 replicas usando el programa Mega 4 (Tamura *et al.*, 1993-2008), para obtener el dendograma.

Microscopia electrónica de barrido

Cinco segmentos de 5 mm² de un fruto inoculado con una suspensión de 2.4×10^4 conidios de *Monilinia* sp, y otros cinco segmentos de un cultivo monospórico en AD₂ se fijaron con gluteraldehído al 2.5 % por 24 h; se enjuagaron 3 veces por cinco min con el amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1 M pH 7.2. Después el material se deshidrató con etanol a diferentes concentraciones (30, 40, 50, 60, 70 80 y 90 %) por una hora y finalmente se repitió tres veces en una concentración de etanol al 100 % por 20 min. Las muestras se colocaron \pm 40 min en una secadora semiautomática de punto crítico (Sandri-780A®), después los fragmentos se pusieron en porta muestras con cinta conductiva adhesiva de cobre y en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat®) se recubrieron con oro por cuatro minutos. La observación de muestras se realizó en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6390®) a 10 Kv.

RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación del patógeno

De los frutos con signos observados en preparativos al microscopio, se observo la producción de esporodocios compuestos por cadenas de conidios hialinos, limoniformes, unicelulares y de hifas septadas, hialinas. Se identifico *Monilinia* spp. a nivel género en base a Barnett y Hunter (1998). Los frutos con síntoma de *Monilinia* sp. fue un color café oscuro en la epidermis del fruto, de consistencia ligeramente suave y que posteriormente se momificó (Fig. 2).

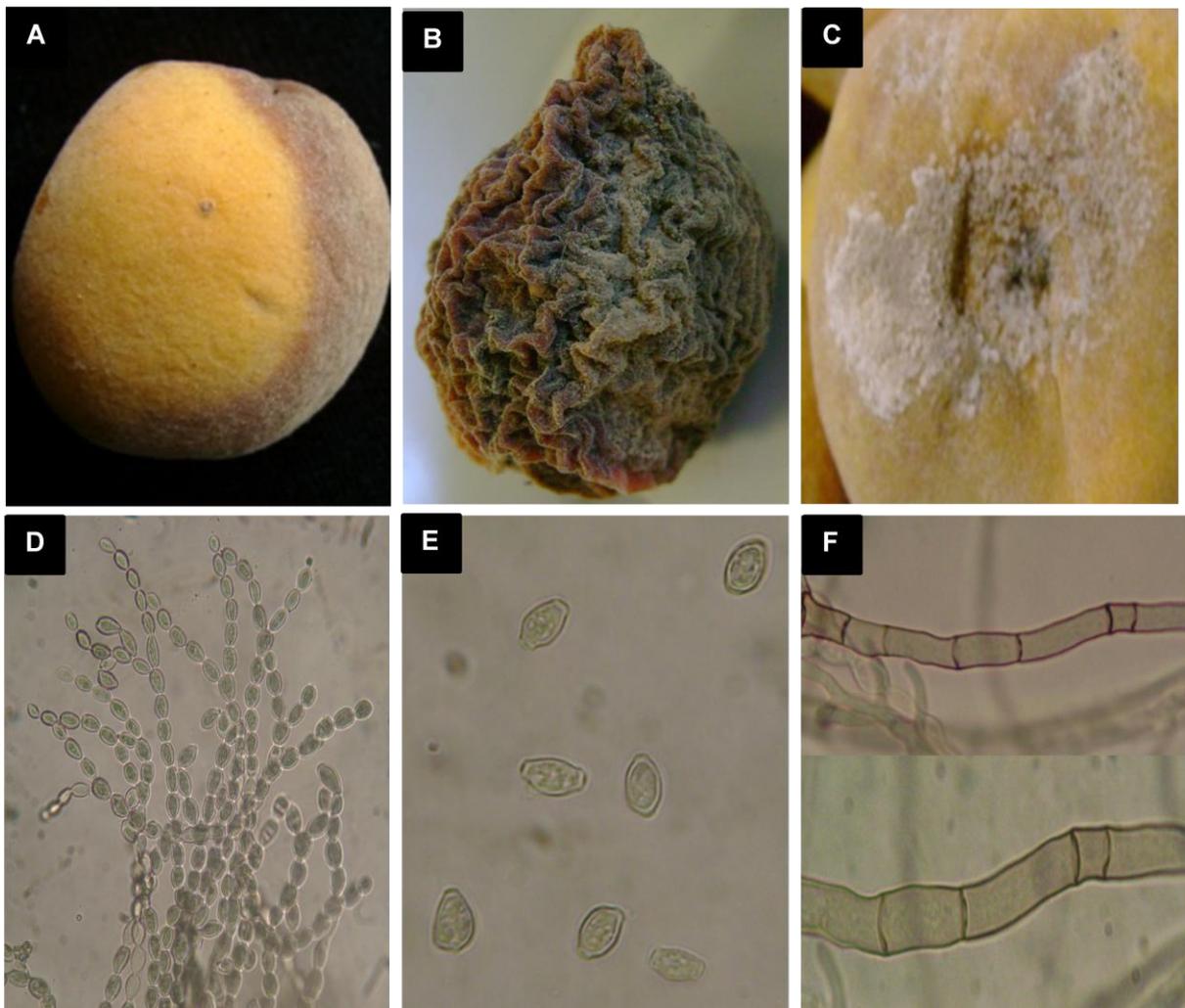


Figura 2. A) Síntoma de la pudrición café por *Monilinia* sp., B) Fruto momificado, C) Esporulación café típica del patógeno en la epidermis del fruto, D) Cadenas de conidios ramificados sobre conidióforos hialinos, E) Conidios hialinos, unicelulares, cortos, limoniformes y F) Hifas septadas, hialinas.

Identificación del medio de cultivo selectivo para *Monilinia*.

Los mejores medios de cultivo para el rápido crecimiento de *Monilinia* sp. fueron PCA, AD₁ y AD₂ a los 8 días después de la siembra (Tabla 2).

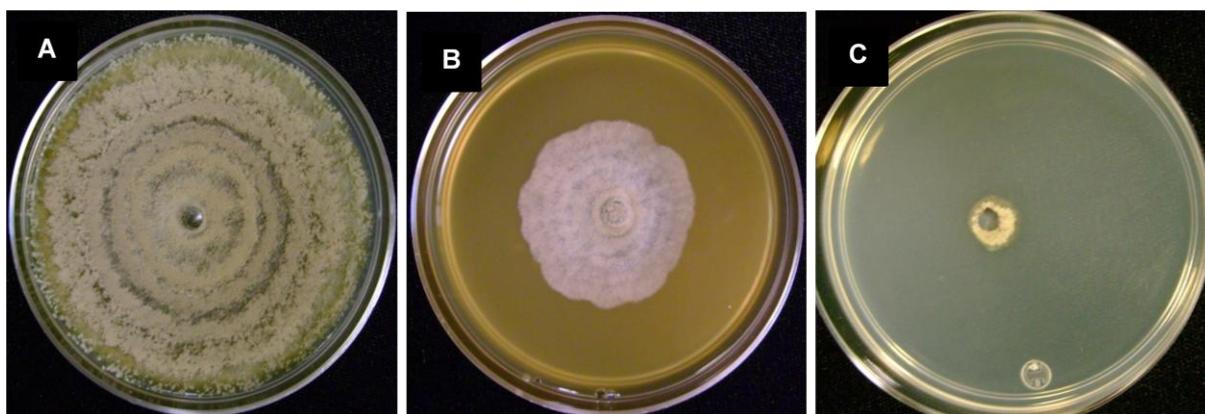


Figura 3. A) *Monilinia* sp., cultivo monospórico de durazno en el medio de cultivo AD₂, B) medio de cultivo MA y C) AD₃ donde *Monilinia* sp. tuvo un menor crecimiento a los 8 días.

Los medios de cultivo que no favorecieron el crecimiento del hongo fueron PCA₂, MA y AD₃, este último con un crecimiento de 1.25 cm (Tabla 2 y Fig. 3).

Tabla 2. Crecimiento de *Monilinia* sp. en 8 medios de cultivo a los 8 días de la siembra.

Medio de cultivo	Crecimiento (cm) a los 8 días
PCA ₁ (200 gr-1000 mL).	5.67 a
AD ₁ (200 gr -1000 mL molido).	5.62 a
AD ₂ (200gr-1000 mL cuadros).	5.17 a
PDAN (200 gr papa-1000 mL).	4.37ab
PDA (39 gr-1000 mL).	3.67bc

PCA ₂ (20 gr-1000 mL).	3.10bc
MA (33.6 gr-1000 mL).	2.80c
AD ₃ (20 gr-1000 mL).	1.25c

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P=0.05$).

Caracterización morfológica

Diámetro de crecimiento de las colonias y características morfológicas de los cultivos monospóricos

La tasa de crecimiento de las colonias en medios de cultivo se usa para la separación de especies. Batra (1979) estableció que *M. laxa* podía diferenciarse de *M. fructigena* y de *M. fructicola* por su menor tasa de crecimiento. El crecimiento de *Monilinia* sp. fue superior en AD₂ respecto a PDA, a los 2 y 6 días de la siembra (Tabla 3 y Fig. 6 y 7).

Tabla 3. Características morfológicas de 50 cultivos monospóricos de *Monilinia* sp. aisladas de durazno, procedentes de cinco Estados de México, observadas a los 7 días de crecimiento en PDA y AD₂, diámetro de las colonias a los 2 y 6 días y dimensión de los conidios a los 12 días, 2009.

Cultivos monospóricos ^z	Diámetro de colonias en cm				ML ^y	ME ^x	CC ^w	AC ^v	AC en PDA ^u	AC en AD ₂ ^u	Dimensiones de los conidios µm en AD ₂
	2 días		6 días								
	PDA	AD ₂	PDA	AD ₂							
MoMi1	2.72	3.38	7.50	8.44	1	1	Mg	1	10	8	24.60+0.77x16.22+0.41
MoMi2	2.44	2.73	6.46	8.45	1	1	Mg	1	8	7	26.37+0.90x17.13+0.44
MoMi3	2.37	3.10	7.41	8.45	1	1	Mg	0	0	0	25.09+1.12x17.50+0.51
MoMi4	2.27	3.16	6.48	8.46	1	1	Mg	0	0	5	24.71+0.82x17.93+0.58
MoMi5	1.97	3.37	6.82	8.45	1	1	Mg	1	5	5	23.82+0.89x17.35+0.52
MoMi6	2.43	2.50	7.92	8.46	1	1	Mg	1	4	8	24.02+0.82x15.66+0.44
MoMi7	1.73	2.73	4.76	8.43	1	1	Mg	1	5	7	26.78+1.33x18.00+0.44
MoMi8	1.93	3.24	4.75	8.45	1	1	Mg	1	4	4	25.43+1.06x18.01+0.75
MoMi9	2.80	3.16	7.92	8.45	1	1	Mg	1	6	7	23.29+0.72x17.67+0.56
MoMi10	2.03	2.66	4.99	8.32	1	1	Mg	1	8	9	27.03+0.76x16.12+0.51
MoMo1	2.36	2.94	4.99	7.79	1	1	Mg	1	4	7	25.44+0.82x18.92+0.41
MoMo2	1.50	2.76	4.70	8.21	1	1	Mg	1	7	7	25.80+0.75x17.75+0.45
MoMo3	1.87	3.16	5.24	8.46	1	1	Mg	1	7	6	23.80+0.83x16.94+0.46
MoMo4	1.36	2.90	4.12	8.41	1	1	Mg	1	6	6	24.54+0.85x17.57+0.42
MoMo5	2.31	3.56	6.19	8.45	1	1	Mg	1	5	4	24.64+0.81x18.59+0.44
MoMo6	1.94	3.33	3.88	8.46	1	1	Mg	1	2	4	25.29+1.03x16.51+0.48
MoMo7	1.65	3.17	4.72	8.45	1	1	Mg	1	5	6	22.96+0.82x16.06+0.49
MoMo8	2.53	2.74	7.23	8.46	0	1	Mg	1	6	8	23.91+0.70x16.94+0.41
MoMo9	1.41	2.70	4.00	8.45	1	1	Mg	1	6	6	25.19+0.87x16.87+0.64
MoMo10	2.24	2.60	5.50	8.46	1	1	Mg	1	8	8	25.65+0.70x16.25+0.45
MoC1	2.20	3.36	5.97	8.46	1	1	Mg	1	10	6	25.64+1.16x16.44+0.56
MoC2	2.18	2.87	5.45	8.47	1	1	Mg	1	8	8	26.47+0.84x16.39+0.57
MoC3	2.80	3.61	8.46	8.46	1	1	Mg	1	6	5	25.54+0.86x17.47+0.55
MoC4	2.13	3.53	6.28	8.46	1	1	Mg	1	3	5	25.28+1.10x16.53+0.59
MoC5	2.23	2.96	5.01	8.52	1	1	Mg	1	8	10	25.32+1.15x16.51+0.56
MoC6	2.04	2.96	5.15	7.59	1	1	Mg	1	10	4	26.23+0.88x16.76+0.40
MoC7	2.14	3.26	5.93	8.46	1	1	Mg	1	4	7	23.45+0.88x16.26+0.50
MoC8	2.05	2.83	5.45	7.12	1	1	Mg	1	10	8	25.03+0.86x16.37+0.40
MoC9	2.13	2.84	5.42	7.82	1	1	Mg	1	8	10	25.19+8.77x16.41+0.55
MoC10	2.30	3.43	4.35	8.46	1	1	Mg	1	8	5	26.18+1.08x16.07+0.53
MoA1	2.47	2.89	7.17	8.46	1	1	Mg	1	10	6	26.18+0.72x18.33+0.47
MoA2	2.01	2.53	6.12	8.46	1	1	Mg	1	8	8	27.26+0.63x18.43+0.48
MoA3	2.04	3.15	6.18	8.46	1	1	Mg	1	9	8	27.34+0.73x18.93+0.51

MoA4	1.79	3.02	4.72	8.46	1	1	Mg	1	8	5	25.33+0.73x17.79+0.49
MoA5	1.90	2.89	5.26	8.4	1	1	Mg	1	8	5	25.69+0.80x18.10+0.43
MoA6	1.97	2.86	5.51	8.47	1	1	Mg	1	9	7	26.00+0.65x16.90+0.52
MoA7	1.90	2.63	5.30	8.47	1	1	Mg	1	8	10	25.57+0.85x17.01+0.45
MoA8	1.83	2.85	5.32	8.47	1	1	Mg	1	11	7	23.29+0.82x16.00+0.51
MoA9	2.57	2.84	8.36	8.6	1	1	Mg	1	2	9	24.15+0.88x16.89+0.47
MoA10	1.81	2.51	4.73	7.66	1	1	Mg	1	7	10	25.24+0.82x16.83+0.49
MoZ1	2.76	3.21	8.46	8.46	1	1	Mg	1	4	7	25.60+0.88x18.24+0.51
MoZ2	2.56	3.04	7.69	8.45	1	1	Mg	1	7	12	26.60+0.75x17.36+0.44
MoZ3	2.43	2.68	5.33	8.53	1	1	Mg	1	6	9	26.60+0.92x17.53+0.50
MoZ4	2.74	3.19	8.46	8.46	1	1	Mg	1	4	5	24.22+0.96x18.07+0.59
MoZ5	2.20	2.65	5.72	8.47	1	1	Mg	1	7	9	25.31+1.05x17.19+0.76
MoZ6	2.14	3.17	6.11	8.46	1	1	Mg	1	4	7	25.17+0.66x17.29+0.41
MoZ7	2.52	3.09	8.41	8.45	1	1	Mg	1	3	5	25.76+0.88x18.20+0.48
MoZ8	2.66	3.14	8.12	8.47	1	1	Mg	1	4	7	24.50+0.83x17.34+0.48
MoZ9	2.63	2.90	8.15	8.47	1	1	Mg	1	4	9	24.91+0.96x17.73+0.54
MoZ10	2.35	2.95	8.45	8.46	1	1	Mg	1	3	6	24.40+0.79x18.00+0.62

^Z MoMo *Monilinia* aislado de Morelos, MoMi *Monilinia* de Michoacán, MoC *Monilinia* de Chihuahua, MoA *Monilinia* de Aguascalientes y MoZ *Monilinia* de Zacatecas.

^Y Márgenes lobulados (ML). 1 lobulados; 0 no lobulados.

^X Presencia de masas estromáticas (ME). 1 presencia; 0 ausencia.

^W Coloración de la colonia (CC). C Crema; Mg Marrón grisáceo.

^V Anillos de crecimiento (AC). 1 presencia; 0 ausencia.

^U Anillos de crecimiento en papa dextrosa agar (AC en PDA); Anillos de crecimiento en agar-durazno (AC en AD).

Los 50 cultivos monospóricos de *Monilinia* sp. fueron morfológicamente similares en márgenes lobulados, presencia de masas estromáticas, color de la colonia y anillos de crecimiento en los medios de cultivo PDA y AD₂ (Fig. 4).

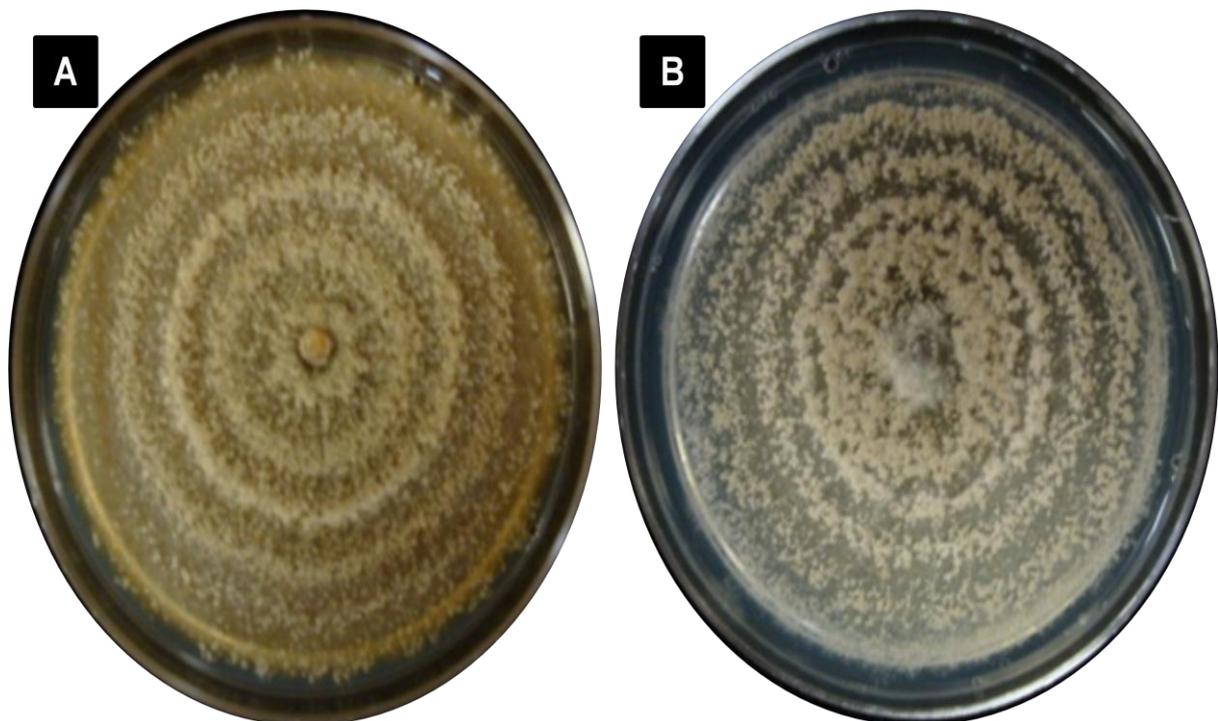


Figura 4. *M. fructicola* con abundante esporulación y anillos de crecimiento en medio de cultivo AD₂ A) y en PDA B), a los 8 días después de la siembra.

La tabla 3, (Fig. 5) a los 2 días y (Fig. 6) a los 6 días indican que los 50 cultivos monospóricos de *Monilinia* sp. crecieron más rápido en AD₂ que en PDA, independientemente de la entidad de donde se aislaron.

En la figura 5, se puede observar que los cultivos monospóricos de menor crecimiento en PDA son MoMo4 con 1.36 cm y MoMo9 con 1.41 cm del mismo estado; ó aislamientos con mayor crecimiento MoC3 y MoMi9 con 2.8 cm. Cultivos monospóricos de menor crecimiento en AD₂ son MoA10 con 2.51 cm y MoMi6 con 2.5 cm; ó aislamientos con mayor crecimiento MoC3 con 3.61 cm y MoMo5 con 3.56 cm. También se observó monospóricos que mantienen su ritmo de crecimiento mayor en ambos medios, como el MoC3 con 2.8 cm en PDA y 3.61 cm en AD₂.

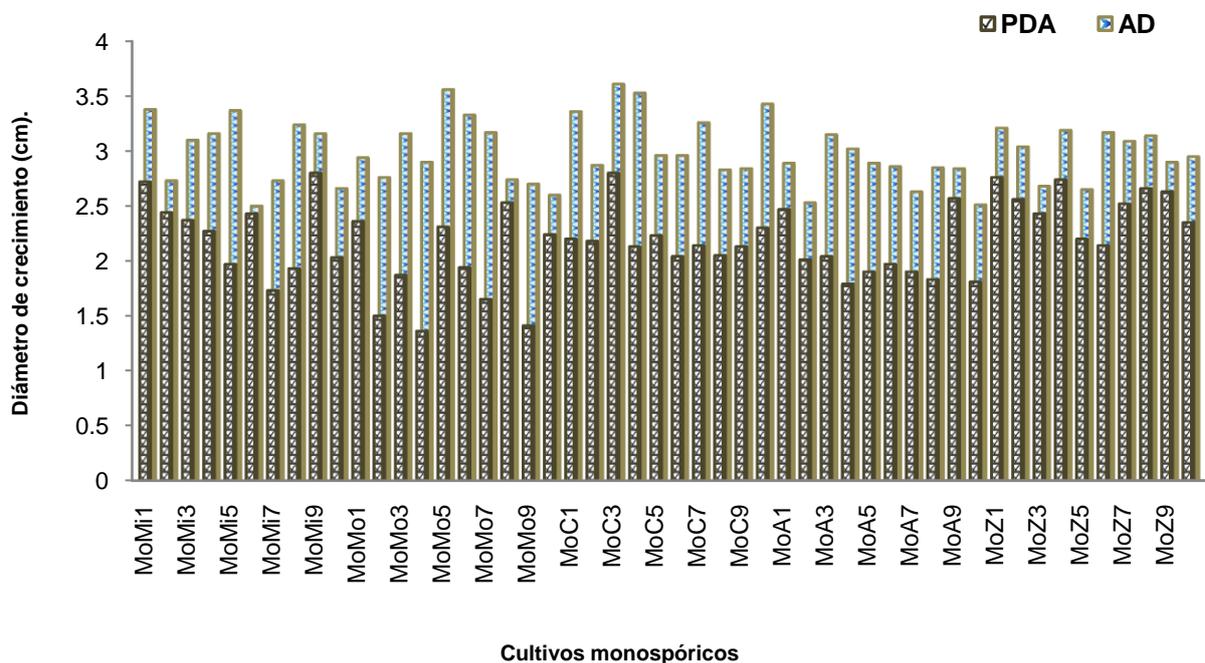


Figura 5. Evaluación de los 50 cultivos monospóricos de *Monilinia* sp. en los medios PDA y AD₂ (agar-durazno) a los 2 días de crecimiento 2009.

A los 6 ddi el crecimiento de los cultivos monospóricos en PDA, fue menor que en AD₂. A los 6 días en PDA hubo crecimientos de 3.88 a 8.46 cm y en AD₂ de 7.11 cm a 8.59 cm.

Hubo cultivos monospóricos con crecimiento igual en PDA y AD₂ (MoC3, MoZ1 y MoZ4), aislamientos de crecimiento lento en PDA y rápido en AD₂ fueron MoMo9, MoMo6 y MoMo4. El cultivo monospóric MoZ4 tuvo crecimiento lento en PDA y AD₂ a los 2 días de evaluación y rápido crecimiento a los 6 días (Fig. 6).

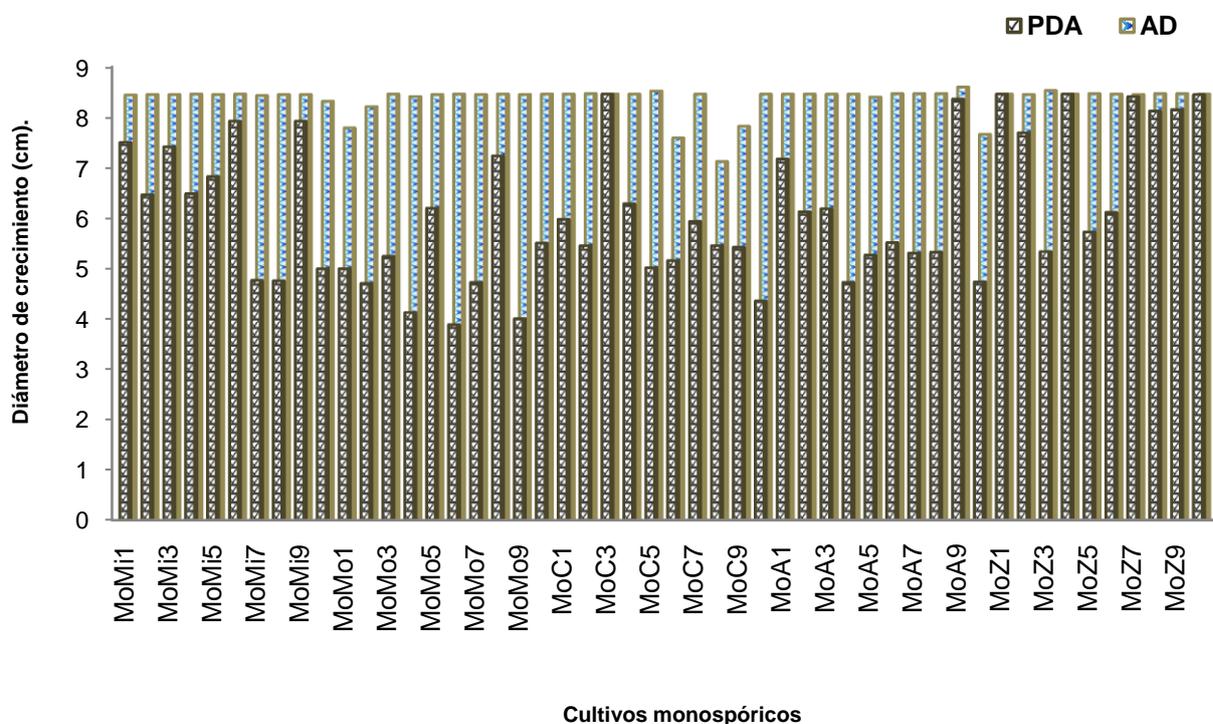


Figura 6. Evaluación de los 50 cultivos monospóricos de *Monilinia* sp. obtenidos de durazno en los medios PDA y AD₂ a los 6 días de crecimiento, 2009.

Las diferencias en el diámetro de crecimiento de los cultivos monospóricos de *Monilinia* sp. a los 2 y 6 días de incubación fue significativo ($P=0.05$). Los monospóricos de Zacatecas (MoZ) fueron los de mejor crecimiento en ambas fechas

de evaluación. Otros variaron, por ejemplo los de Chihuahua (MoC) a los 2 días fueron segundo en mejor crecimiento, pero a los 6 días fue el cuarto (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación del crecimiento en centímetros de los cultivos monospóricos de *Monilinia* sp. de los cinco Estados en PDA y AD₂ a los 2 y 6 días de la siembra.

Estado	2 días	6 días
Zacatecas	2.75a	7.98a
Chihuahua	2.69ab	6.96b
Michoacán	2.64abc	7.47ab
Morelos	2.45bc	6.71b
Aguascalientes	2.42c	7.13b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P=0.05$).

El mejor medio de cultivo para el crecimiento de *Monilinia* sp. fue AD₂ (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación del crecimiento en centímetros de los cultivos monospóricos de *Monilinia* sp. en PDA y AD₂ a los 2 y 6 días de la siembra.

Medio de cultivo	2 días	6 días
AD ₂	2.99a	8.37a
PDA	2.19b	6.13b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P=0.05$).

Los 50 cultivos monospóricos de *M. fructicola* tuvieron mayor crecimiento que *M. laxa* y *M. fructigena*, a los 4 días de evaluación en AD₂ con una media de crecimiento mínimo de 4.8 ± 0.84 cm y un máximo de 7.7 ± 0.42 cm. A los 6 días en PDA obtuvieron, una media de crecimiento mínimo de 3.88 ± 0.08 cm y máximo de 8.46 ± 0.01 cm. El crecimiento mínimo de *M. fructicola* fue menor comparado con el *M. laxa* (4.70 ± 3.08) (desviación estandar muy alta, con 22 aislados) y *M. fructigena* (6.86 ± 0.70 , con 6 aislados) registrados por Muños *et al.* (2008). Sin

embargo, el crecimiento máximo de *M. fructicola* fue superior a las otras dos especies. *M. fructicola* tuvo mayor crecimiento en AD₂ que en PDA (Tabla 6).

Batra (1979) estableció que *M. laxa* podía diferenciarse de *M. fructigena* y de *M. fructicola* por su menor tasa de crecimiento.

Tabla 6. Comparación del crecimiento en centímetros de colonias de *Monilinia laxa* y *M. fructigena* evaluados a los 4 y 7 días (Muños *et al.*, 2008) y a los 6 días en la presente investigación con 50 cultivos monospóricos de *M. fructicola*, 2009.

Medio-días	<i>M. laxa</i> 22 aislados	<i>M. fructigena</i> 6 aislados	<i>M. fructicola</i> 50 cultivos monospóricos
PDA-4	1.76±0.41-5.90±0.71	4.19±0.40-4.62±0.85	2.2±0.53- 6.1±0.7 \bar{x} = 4.34±0.51
AD ₂			4.8±0.84- 7.7±0.42 \bar{x} = 6.12±0.39
PDA-6	—	—	3.88±0.08 - 8.46±0.01 \bar{x} = 6.13±1.39
AD ₂			7.11±0.3 - 8.59±0.22 \bar{x} = 8.37±0.28
PDA-7	4.70±3.08- 7.86±1.08	6.86±0.70-7.83±0.78	—

Hubo variación en la producción de anillos de crecimiento de los cultivos monospóricos en los medios PDA y AD₂, por ejemplo: el monospórico MoMi1 produjo 10 anillos en PDA y ocho anillos en AD₂, MoMi6 produjo cuatro anillos en PDA y ocho en AD₂, MoMi5, tuvo cinco anillos tanto en PDA como en AD₂ y MoMi3 no presentó anillos en ambos medios (Tabla 3). Muños *et al.* (2008) al evaluar aislados de *M. fructigena* y *M. laxa* a los 15 días de incubación, observó para *M. laxa* colonias color marrón grisáceo, poco prominentes, márgenes ondulados, anillos de crecimiento oscuros; en *M. fructigena* observó colonias color crema, crecimiento uniforme y continuo, márgenes de la colonia no lobulados y abundante micelio aéreo en correspondencia con zonas de mayor esporulación. También mencionó que algunas especies de *M. fructigena* se asemejaban a las de *M. laxa* por su aspecto en forma de roseta y la presencia de círculos de crecimiento y que la formación de

abundante masa estromática en *M. fructigena* solo se observó en un aislamiento de *M. laxa*. En nuestro caso, *M. fructicola* desarrolló colonias parecidas a *M. fructigena*. *M. fructicola* esporuló con abundantes estromas y spermacios y márgenes de la colonia no lobulados a los tres días en malta agar. El crecimiento en PDA al 2%, con luz diurna permitió distinguir *M. laxa* de *M. fructicola*; *M. fructicola* se desarrolló rápidamente, con aros concéntricos de muchas esporas, *M. laxa* creció más despacio y las colonias fueron lobuladas con pocas esporas (CABI y EPPO, 1990). En nuestro caso, *M. fructicola* también produjo aros concéntricos de esporulación y márgenes de la colonia lobulados en PDA y AD₂. Los cultivos de ambas especies bajo luz continúa esporularon profusamente, especialmente sobre agar con tomate o harina de avena y sobre trozos de melocotón, albaricoque o pera. Ogawa (1999) afirmó que otro método de diferenciación fue inocular pera verde madura donde *M. fructicola* esporuló abundantemente, mientras que la esporulación de *M. laxa* fue escasa. La esporulación profusa en nuestro medio AD₂ que contiene trozos de durazno, coincidió con lo registrado por Ogawa (1999).

Las medidas de los conidios en el presente trabajo fueron de 23 - 27.3 x 15.7 - 18.6 μm , a los 12 días de la siembra en AD₂ a temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y luz ambiental, no coincidieron con las de CABI y EPPO (1990): 14.5 - 16 x 9.5 - 11 μm a los 3 días en malta agar y luz continua, Ogawa (1999): 8 - 28 μm por 6 - 19 μm en PDA al 2% con luz continua o con Santiago (2008): 8.9-11.2 x 4.5-4.9 μm en PDA con temperatura de 24°C a los 4 días de la siembra. La diferencia de las medidas de los conidios pudieran explicarse por los medios empleados, las condiciones de incubación y el origen geográfico de los conidios.

La colonia de *Monilinia sp.* fue de forma circular concéntrica, con abundante producción de masas estromáticas en grupos o ramilletes (esporodoquios), conformados de cadenas de conidios hialinos, cortos, elípticos o limoniformes, unicelulares, ramificados sobre conidióforos hialinos y cortos, con hifas septadas, hialinas y bifurcadas, produce microconidios (espermacios o gametos masculinos) que en medio de cultivo forman cadenas sobre conidióforos en forma de botella, que al parecer intervienen en la fecundación del hongo en la producción de apotecios (Fig.7). Estas observaciones coincidieron con Mendoza y Pinto (1985), Manzanares (1993), Barnett y Hunter (1998) y Agrios (2002).

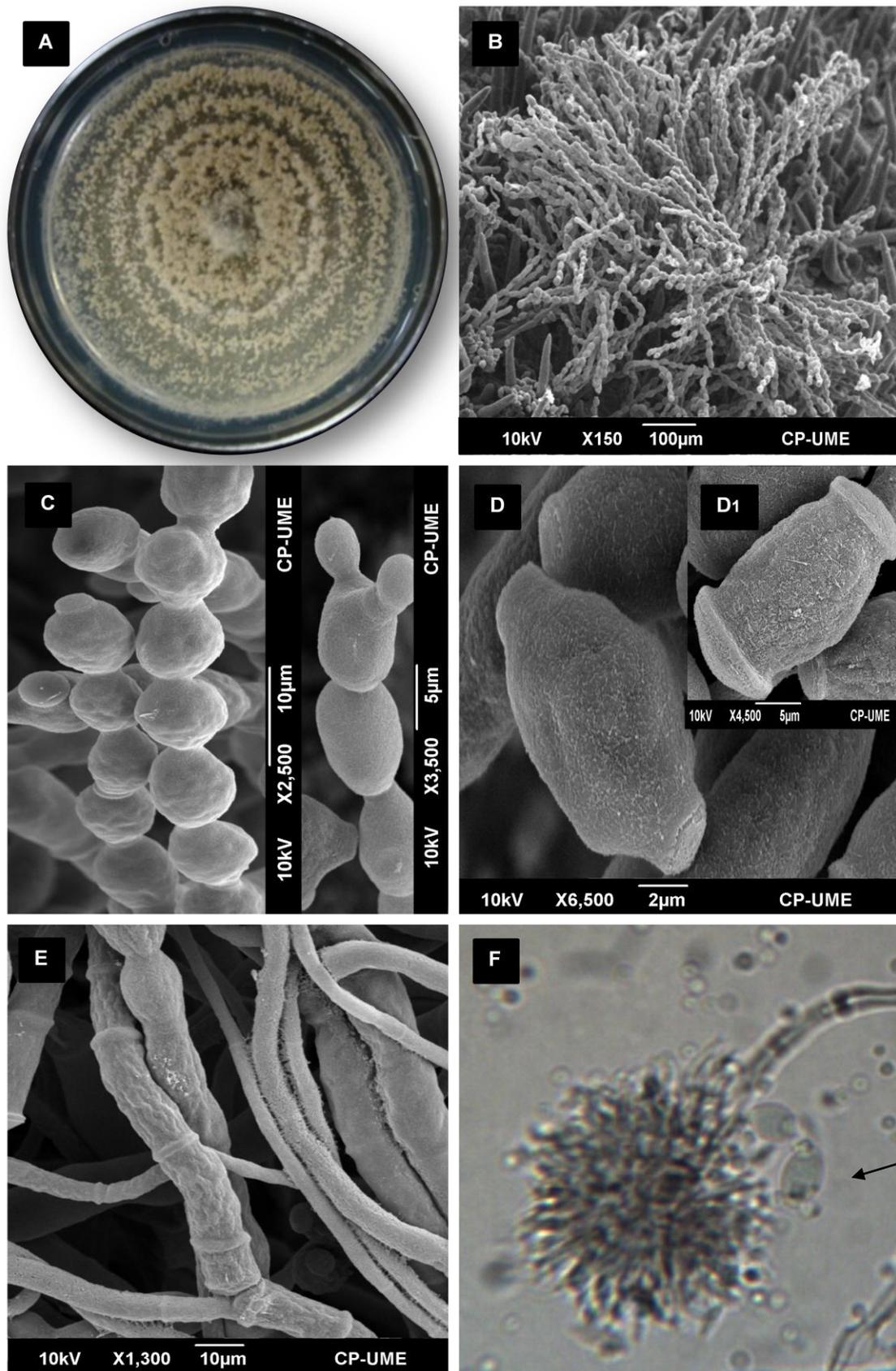


Figura 7. A) Crecimiento característico anillado de *Monilinia fructicola* aislado de durazno, B) agrupación de esporodocios C) formación de cadenas de conidios D) formación de conidios

conidios hialinos, limoniformes, cortos, unicelulares de fruto inoculado y D1) de medio AD₂, E) presencia de hifas septadas, hialinas y bifurcadas y F) microconidios (espermacios) circulares sobre conidióforo en forma de botella.

Hubo diferencia en la forma de los conidios de *Monilinia* sp. obtenidos por Microscopia Electrónica de Barrido, la base de los conidios obtenidos en AD₂ fue más ancha (Fig. 3D1), comparada con los obtenidos del fruto inoculado (Fig. 3D), esta diferencia posiblemente a las condiciones en que se desarrollo el patógeno.

Lane (2002) mencionó que la identificación morfológica y cultural de las diferentes especies presenta dificultades por las diferencias cualitativas y cuantitativas de las colonias entre los aislados de una misma especie. Tjasa *et al.* (2007) afirmó que la morfología de diferentes especies es similar. Muños *et al.* (2008) indicó que no hay un carácter morfológico específico que permita separar las distintas especies, por lo que sugiere usar métodos moleculares, Ogawa (1999) probó la diferenciación de especies mediante electroforesis y la serología. Malvárez *et al.* (2001) propusieron iniciadores específicos para la identificación rápida y fiable de las especies de *Monilinia*. La identificación molecular puede detectar directamente al patógeno en el huésped sin necesidad de aislarlo y cultivarlo (Fulton y Brown, 1997 y Tjasa *et al.*, 2007).

La comparación de las variables de la tabla 3, mediante un análisis multivariado con apoyo del programa Minitab, dio como resultado un dendograma de similaridad. La mayoría de los cultivos monospóricos se agruparon con una similaridad aproximada de 83 %. Se observó que los cultivos monospóricos MoMi4, MoMo9, MoMi1 y MoZ2 fueron agrupados con un 77 % de similaridad, MoC9 con un 70%, MoMi3 con 60% y MoMo5 con 33.07 % aproximadamente (Fig. 8).

Similaridad de *M. fructicola*

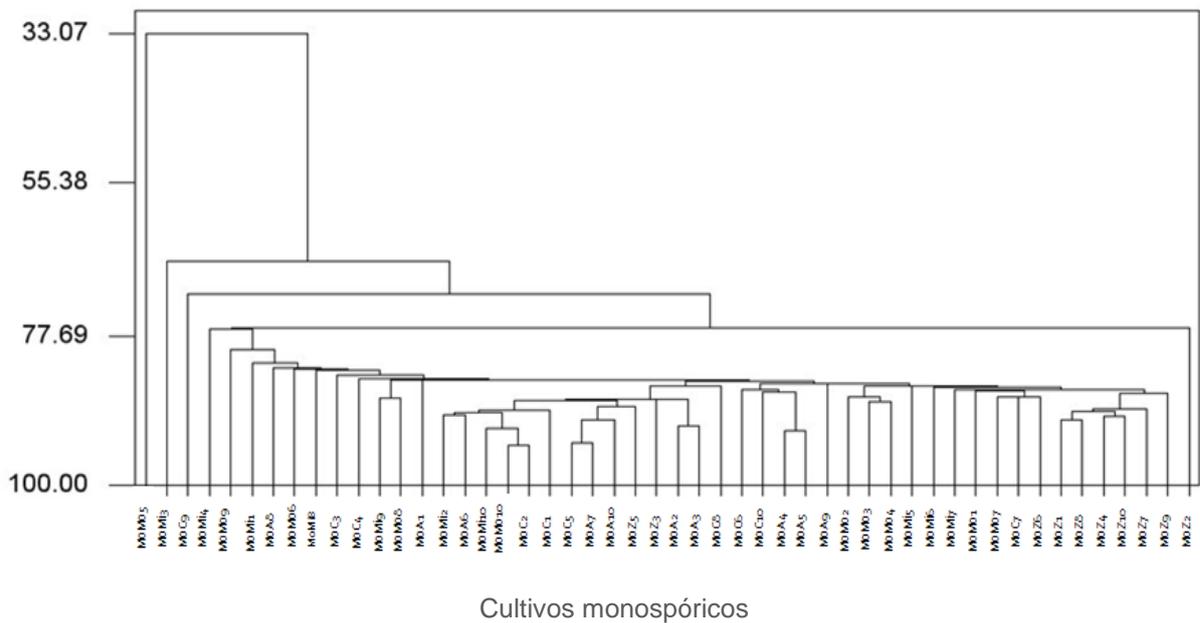


Figura 8. Dendrograma de la caracterización morfológica de los 50 cultivos monospóricos de *M. fructicola*, aislados de durazno de cinco entidades de México, 2009.

Caracterización molecular

Una banda de 500 pb fue obtenida por PCR para cada cultivo monospórico (Fig. 9), Ma *et al.* (2003) obtuvieron una banda de 500 pb a partir de conidios de *M. fructicola*, con cuatro iniciadores (EMfF + EMfR y IMfF + IMfR) aislados o combinados. Côté *et al.*, (2004) combinó los iniciadores diseñados, [(Mo368-5 (TGGAAGTTTTGACACCT), MO368-8R (TCAAACATCGTCCATCT), MO368-10R (GTACCAGGG), laxa-R2 (CTTCAG)], para la amplificación de las bandas de la misma región genómica de *M. fructicola* y *M. laxa* resultando un producto de 402 pb

para *M. fructigena*, de 535 pb para *M. fructicola*, de 351 pb para *M. laxa* y de 425 pb para *M. polystroma* aislados de manzana, pb que se encuentran ligeramente por arriba de los obtenidos para *M. fructicola*. Fulton y Brown (1997) localizaron un grupo intrón I de 418 pb en la subunidad pequeña (SSU) del ADNr de *M. fructicola* que está ausente en *M. laxa* y *M. fructigena* y con una PCR específica, amplificaron un producto de 444 pb para *M. fructicola*, aislada de ciruela. El diseño de iniciadores específicos para *M. fructicola* ha sido utilizado con éxito (Förster y Adaskaveg, 2000).

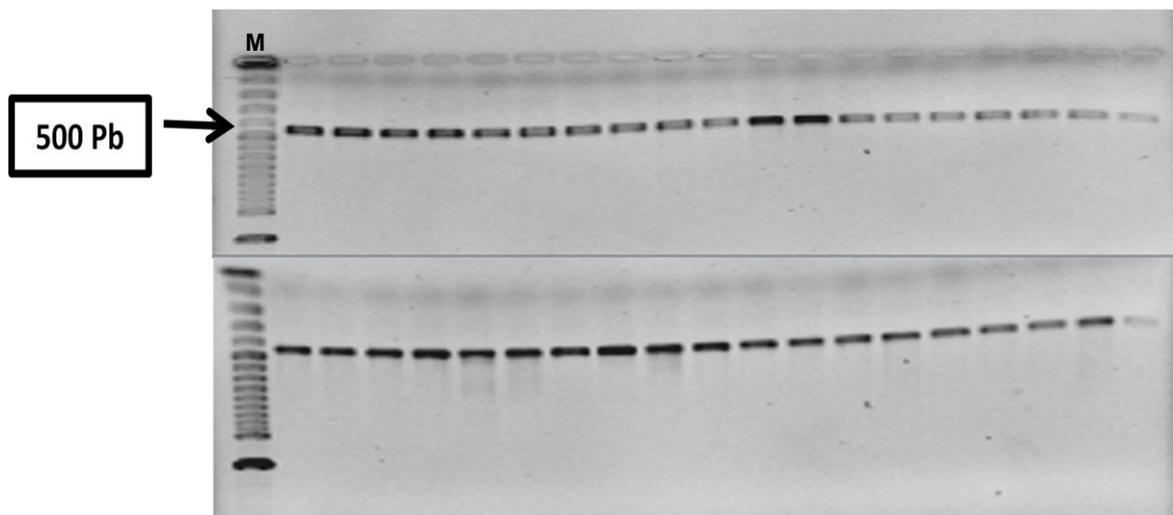


Figura 9. Producto de PCR obtenido mediante la amplificación con iniciadores universales para *Monilinia* sp. M: marcador de 100 pares de bases.

Los DNA de 45 de los cultivos monospóricos de *Monilinia* spp. fueron depositados en el GenBank® de NCBI para su homologación dando como resultado *Monilinia fructicola* con número de acceso FL515894 siendo el valor más alto de identidad. Todos los cultivos monospóricos se agruparon con la especie *Monilinia fructicola*, y se separaron de las especies de *M. fructigena*, *M. laxa* y *M. polystroma* (Fig. 10).

Fulton *et al.* (1999) citado por Côté *et al.* (2004) mencionaron la presencia de un intrón ribosomático en la subunidad pequeña. Carbone y Kohn (1993), Arne *et al.* (1997) y Fulton *et al.* (1999) observaron que dentro de las secuencias de los espacios internos ribosomáticos transcritos (ITS) de las regiones de las especies se ha notificado el intrón, lo cual revela un alto nivel de similitud entre aislados de misma especie. Fulton y Brown (1997) diseñaron iniciadores que amplifican diferencialmente *M. fructicola*, los iniciadores mfs-3 y NS5 amplificaron un fragmento de 444 pb correspondiente al intrón I de la región 18 S. El intrón no es producto de PCR amplificado en algunos aislados de *M. fructicola* lo que sugiere que algunas cepas carecen del intrón (Fulton *et al.*, 1999, Förster y Adaskaveg, 2000, Hughes *et al.*, 2000 y Côté *et al.*, 2004,). Förster y Adaskaveg (1999) consiguieron resultado positivo en 7 de 21 aislamientos como *M. fructicola*, debido a la variabilidad genética entre aislados a consecuencia del intrón I en el rDNA lo cual lo confirmaron por análisis de RAPD con otros iniciadores que todos eran *M. fructicola*. Es por ello que Penrose *et al.* (1976), citado por Côté *et al.* (2004), indicaron que la identificación morfológica es difícil ya que el intrón varían entre aislamientos dentro de las especies o de una misma especie. Probablemente por ello en la figura 9, se observan diferentes agrupamientos dentro de la misma especie, independientemente de la región geográfica de origen (Fig. 10).

Agrupamiento de *M. fructicola*

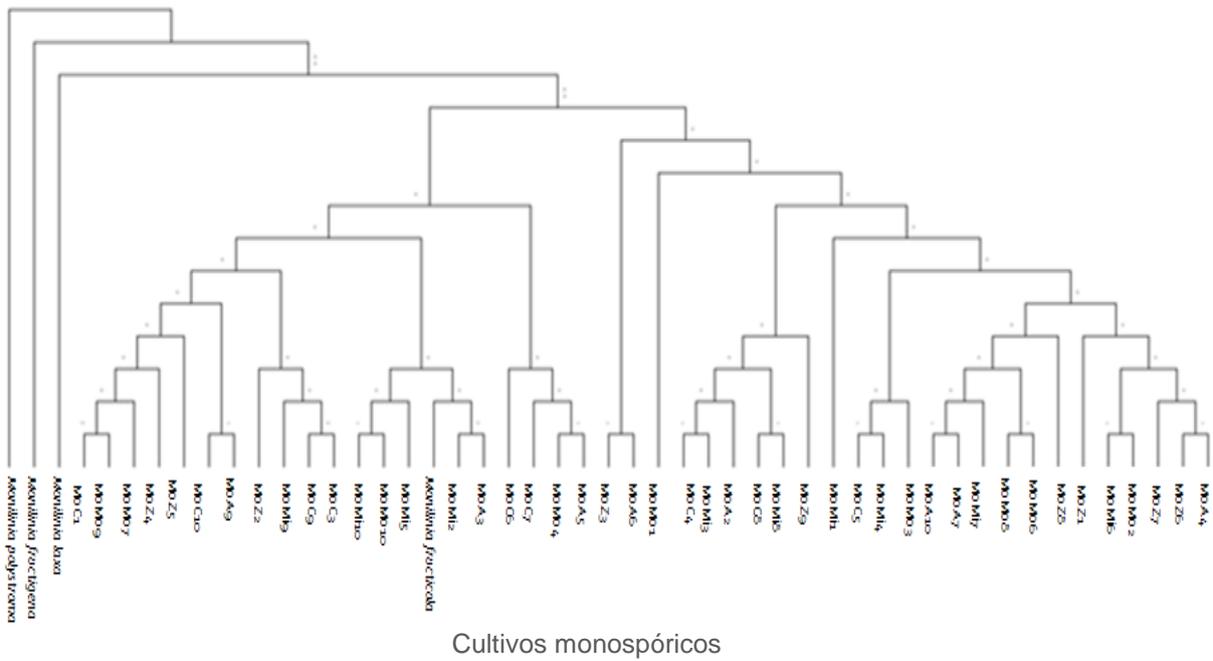


Figura 10. Dendrograma obtenido de las secuencias de 45 cultivos monospóricos de *M. fructicola* de durazno de cinco entidades de México, comparadas con las especies *M. polystroma*, *M. fructigena* y *M. laxa* que son las tres del extremo izquierdo, 2009.

CONCLUSIONES

El hongo causante de la pudrición café en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Michoacán, Morelos y Zacatecas fue *Monilinia fructicola*, con base morfológica y molecular. *Monilinia* creció un 100 % más rápido en AD₂ que en PDA a los 7 días. *M. fructicola*, expresó una mayor variabilidad morfológica en PDA. La morfología de los cultivos monospóricos provenientes de los cinco Estados fue similar.

LITERATURA CITADA

- Agrios, N.G. 2002. Fitopatología. Ed. Limusa. México. 838 p.
- Ahrens, U., and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 15S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- Arne, H. J., Kohn, M., Kjetill S. J., and Trond S. 1997. Molecular Phytopathogeny and Evolution of *Monilinia* (Sclerotiniaceae) based on coding and noncoding rDNA sequences. *American Journal of Botany* 84: 686-701.
- Barnett, H., and B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. The American Phytopathological Society. Minnesota. 4a. ed. 217p.
- Batra, L.R. 1979. First authenticated North American record of *Monilinia fructigena*, with notes on related species. *Mycotaxon* 8: 476-484.
- Batra, L. R. 1991. World species of *Monilinia* (fungi): Their ecology, biosystematics and control. *Mycologia Mem.* 16:1-246.
- Boehm, E.W.A., Ma, Z., and Michailides, T.J. 2001. Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. *Phytopathology* 91: 428-439.
- Byrde, R. J. W., and Willetts, H. J. 1977. The Brown Rot Fungi of Fruit. Their Biology and Control. Pergamon Press. Oxford. pp. 171.
- CABI and EPPO, 1990. *Monilinia fructicola*. Data Sheets on Quarantine Pests. pp.1-5.
- Carbone, I., and Kohn, L. M. 1993. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the *Sclerotiniaceae*. *Mycologia* 85: 415–427.
- Côté, M.J., Meldrum, A. J., and Tardif, M.C. 2004a. Variations in sequence and occurrence of SSU rDNA group I introns in *Monilinia fructicola* isolates. *Mycologia* 96:240-248.
- Côté, M. J., Meldrum, A. J., and Tardif, M. C. 2004b. Variations in sequence and occurrence of SSU rDNA group I introns in *Monilinia fructicola* isolates. *Mycologia* 96: 240-248.
- Côté, M. J., Tardif, M. C., and Meldrum, A. J. 2004. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using Multiplex PCR. *Plant Dis.* 88: 1219-1225.
- Förster, H., and Adaskaveg, J.E. 1999. Early Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology* 90:171-178.

- Förster, H., and Adaskaveg, J. E. 2000. Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology* 90:171-178.
- Fulton, C. E., and Brown, A. E. 1997. Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. *Department of Applied Plant Sciences* 157: 307-312.
- 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. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:495-500.
- Guang, Y. W., Michailides, T. J., Hammock, B. D., Young, M. L., and Bostock, M. R. 2002. Molecular cloning, characterization, and expression of a redox-responsive cutinase from *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. *Plant Pathol.* pp. 261-276.
- Hughes, K.J.D., Fulton, C.E., McReynolds, D. and Lane, C.R. 2000. Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 30, 507-511.
- Lane, C.R. 2002. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. *Bull. OEPP/EPPO* 32: 489-493.
- Loos, R., and Frey, P. 2000. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *Eur. J. Plant Pathology* 106: 373-378.
- Ma, Z., Luo, Y., and Michailides, T. J. 2003. Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. *Phytopathology* 151: 312-322.
- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B. G., Vos, P., and Oliver, R. P. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* 100: 1107-1111.
- 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* 5: 48-53.
- Manzanares M. R. 1993. Control químico de la cenicilla (*Sphaeroteca pannosa* Wal Lev.) y de la pudrición morena (*Monilinia fructicola* Wint Honey) del durazno. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Centro de estudios profesionales. Tesis. Cocula Guerrero. 105p.
- Martin, R. R., James, D., and Levesque, C. A. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies of plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 207-239.

- Mendoza, Z.C. y Pinto, C.B. 1985. Principios de Fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, México. 311p.
- Muñoz, Z., Moret, A., y Bech, J. 2008. Morphological y molecular characterization of *Monilinia* sp. isolates and pathogenicity on apple. *Agrociencia*. 42: 119-128.
- Ogawa, J. M., and English, W. H. 1960. Relative pathogenicity of two brown rot fungi, *Sclerotinia laxa* and *Sclerotinia fructicola*, on twigs and blossoms. *Phytopathology* 50: 550-558.
- Ogawa, J. M., Zehr, E. I., George, W. B., Ritchie, F. D., Kiyoto, U., y Uyemoto, J.K. 1999. Plagas y enfermedades de los frutales de hueso. La Sociedad Americana de Fitopatología. 105p.
- Penrose, L.J., Tarran, J., and Wong, A.L. 1976. First record of *Sclerotinia laxa* in New South Wales: differentiation from *S. fructicola* by cultural characteristics and electrophoresis. *Australian Journal of Agricultural Research* 27: 547-556.
- Santiago, S. V., Ayala, E.V., y Nava D.C. 2008. Identificación y caracterización molecular del agente causal de la pudrición morena del durazno en Hidalgo y Tlaxcala, México. Memoria del XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. En Monterrey Nuevo León del 20-24 de Julio del 2008.
- Sonoda, R. M., Ogawa, J. M., and Manji, B. T. 1982. Use of interactions of cultures to distinguish *Monilinia laxa* from *M. fructicola*. *Plant Dis.* 66: 325-326.
- Snyder, C. L., and Jones, A. L. 1999. Genetic variation between strains of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. *Plant Pathology*. 21: 70-77.
- Tamura, K.J., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.** 2008. Molecular evolutionary genetics analysis (**MEGA**) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599.
- Tarran, J. D. 1980. Comparative studies on *Monilinia fructicola* and *M. laxa* with particular reference to conidial production and germination. *Plant Pathology*. 84: 686.
- Tjaša, G., Branka, J., Alenka, M., Franci, C and Jernej, J. 2007. Intraspecific variability in the phytopathogenic *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey. Department of Agronomy pp. 295-299.
- Van Leeuwen, G. C. M., and Kesteren, H.A. 1998. Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Can. J. Bot.* 76: 2042-2050.
- Van Leeuwen, G. C. M., Baayen, R. P., Holb, I.J., and Jeger, M. J. 2002. Distinction of the asiatic brown rot fungus *Monilinia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycol. Res.* 106:444-451.

- Visarathanonth, N., Kakishima, M., and Harada, Y. (1988) Brown rot of grape berry caused by *M. fructicola*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 54: 238-241.
- Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingers-printing genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids res.* 18: 7213-7218.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *In: PCR.* pp: 315-322.

CAPITULO II. AGRESIVIDAD DE *Monilinia fructicola in vitro* SOBRE DURAZNO, PERA Y MANZANA.

Leticia Robles Yerena, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010.

La pudrición café es la enfermedad de mayor importancia del durazno en precosecha y postcosecha. Causando pérdidas de 50 al 100 % en los huertos, y durante el transporte y comercialización. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la agresividad de 50 cultivos monospóricos de *Monilinia fructicola*, 10 de cada uno de los Estados de Aguascalientes, Chihuahua, Michoacán, Morelos y Zacatecas durante el 2008 - 2009. Frutos de durazno Diamante criollo fueron inoculados, y a los 2 y 5 días después de la inoculación (ddi) el diámetro de las lesiones se evaluó. Los frutos desarrollaron necrosis gradual de la epidermis y anillos concéntricos de esporulación café. Diferencias en agresividad de los cultivos monospóricos no fue significativa ($P=0.05$). Frutos inoculados de peras y manzanas mostraron síntomas y signos similares a los frutos de durazno. Manzanas desarrolló masas de esporodoquios de crecimiento aleatorio, no concéntrico. La agresividad de *M. fructicola* a los 8 ddi fue significativamente mayor en pera que en manzana ($P=0.05$). A mayor periodo de incubación mayor el diámetro de lesión en pera y manzana ($P=0.05$).

Palabras clave: Pudrición café, patogenicidad, postcosecha.

AGGRESSIVENESS OF *Monilinia fructicola* ON PEACH, PEAR, AND APPLE.

**Leticia Robles Yerena, M.Sc.
Colegio de Postgraduados, 2010.**

Brown rot is the most important disease of peach, before and after harvest causing losses from 50% to 100%, in the orchards, and during transport and marketing. The objective of the present work was to characterize the aggressiveness of 50 monosporic cultures of *Monilinia fructicola*, 10 from each of the states of Aguascalientes, Chihuahua, Michoacan, Morelos, and Zacatecas, during 2008 and 2009. Diamante peach fruits were inoculated, and 2 to 5 days after inoculation (dai) the diameter of the lesions was evaluated. The fruit epidermis developed gradual necrosis, as well as brown and concentric spore rings. Differences in aggressiveness of the 50 were not significant ($P=0.05$). Inoculated Pear fruits inoculated with five monosporic cultures, one from each state, showed symptoms and signs similar to those of peach fruits. Apples differed in developing random growing, non-concentric sporodochia masses. The aggressiveness of *M. fructicola*, 8 dai, was significantly higher in pear than in apple ($P=0.05$). The longer incubation period the larger lesion diameter in pear and apple ($P=0.05$).

Key words: Brown rot, pathogenicity, post-harvest.

INTRODUCCIÓN

Monilinia fructicola es uno de los patógenos más importantes de las especies de frutas de hueso en donde causa la pudrición café (Ogawa e English, 1991, citado por Ogawa *et al.*, 1999). Esta enfermedad ocurre en todos los países donde se cultivan frutales de hueso. La enfermedad ocurre en zonas con primaveras y veranos húmedos y cálidos, en donde se dificulta su control y puede ocasionar grandes pérdidas durante la maduración de los frutos y en su comercialización (Mondino, 1997, Malvárez *et al.*, 2001, Agrios, 2002 y Fruticultura y Diversificación, 2007). En infecciones severas y deficiente control, del 50 al 75% de los frutos se pudren en los huertos y en la comercialización (Agrios, 2002, Luo y Michailides, 2003 y Fruticultura y Diversificación, 2007). Michailides y Morgan (1997) mencionaron infecciones de un 43 a 69 % de la pudrición café (*M. fructicola* o *M. laxa*) en frutos contiguos en comparación con frutos solitarios, los conidios de *M. fructicola* germinaron más abundante y rápidamente.

El rendimiento disminuye también porque el hongo induce atizonamiento en flores, puede permanecer en un estado de reposo en la epidermis de frutos inmaduros hasta la madurez de cosecha, produciendo infecciones latentes que se activan para dar lugar a la colonización y destrucción de la fruta (Prusky, 1996). Ibbotson-Darhowerx *et al.* (1998) y Luo y Michailides, (2001) observaron que la fruta es más susceptible aproximadamente dos semanas antes de madurez completa. Las frutas momificadas en los árboles o en el suelo son importantes fuentes de inóculo secundario (Landgraf y Zehr, 1982, Biggs y Northoyer, 1985, Ogawa e English, 1991 citado por Ogawa *et al.*, 1999; Northoyer y Biggs, 1995, Holtz *et al.*, 1995, Michailides y Morgan 1997 y Hong *et al.*, 1997).

Los síntomas en los frutos aparecen cuando se aproximan a su madurez, pequeñas manchas circulares de color café, que se extienden con rapidez en todas direcciones y, dependiendo de la humedad, se cubren con ramilletes de conidios de color cenizo, los cuales brotan a través de la cascara del fruto y se esparcen en anillos concéntricos sobre la superficie del fruto. Los frutos infectados se momifican y permanecen colgados del árbol o caen en el suelo. En ocasiones aparecen canchales sobre ramas que se secan y mueren (Agrios, 2002, Fruticultura y Diversificación, 2007).

Los primeros órganos atacados son las flores; luego de invadir los estambres, pistilo, el ovario, los pétalos o sépalos y el pedúnculo la infección avanza sobre el brote. Las flores marchitas quedan cubiertas por una masa de conidios y pueden caerse o permanecer adheridas a la rama. El brote floral muere y también el resto de las flores, que luego son invadidas por otras especies de hongos. Los frutos pueden ser infectados inmediatamente después del cuajado, manifestándose la enfermedad antes o después de la cosecha. La infección del fruto se produce directamente a través de la cutícula, en la base de los tricomas o a través de rajaduras y heridas (Silvera *et al.*, 2004 y Fruticultura y Diversificación, 2007).

El factor más importante para que ocurra infección es la humedad, con 100 % de HR todos los órganos florales son atacados. Los conidios se forman con temperaturas entre 5 y 30 °C, con un óptimo de 20 a 25 °C, se dispersan por la lluvia y el viento, y para que la infección tenga éxito se requieren de 27 o 29 horas de humedad, independientemente de la temperatura (Agrios, 2002 y Silvera *et al.*, 2004).

Las infecciones latentes de *M. fructicola* ocurren en la floración y en frutos inmaduros, y después de un período de inactividad, que puede durar varias semanas, se manifiestan cuando los frutos maduran (Jenkins *et al.*, 1965, Northover y Cerkauskas, 1994 y Hong *et al.*, 1997 citado por Leeuwen *et al.*, 2000).

Van Leeuwen *et al.*, (2000) demostraron que las conidias de *M. fructigena* son fácilmente esparcidas en cortas distancias, facilitando la diseminación dentro de un árbol, aunque la infección final depende de la presencia de lesiones en la cáscara de la fruta para la penetración. Bannon *et al.*, (2008) mencionaron que las heridas son requisito para la infección de *M. fructigena*, independientemente de la concentración de conidios en la epidermis del fruto. Esta especie se extiende solo en las frutas almacenadas contiguas, a través de los poros corticales o lenticelas (Luo y Michailides, 2003 y Plantpro, 2009). Por ello las pérdidas causadas por *M. fructigena* en pre-cosecha son menores que las causadas por *M. fructicola*, que no requiere de heridas (Leeuwen *et al.*, 2000).

Las pérdidas por *M. fructigena* no exceden al 5 % en pre-cosecha y aumenta gradualmente en postcosecha. Esta especie provoca la pudrición de manzanas y peras maduras. La infección ocurre por heridas mecánicas, granizadas, insectos, aves y polillas de la hoja de la manzana (Leeuwen *et al.*, 2000). *M. fructigena* causó en Europa pérdidas del 5 % al 35 % en manzanas, peras y ciruelas, en veranos calurosos (Mackie *et al.*, 2005). *M. laxa* f. *mali* causa la marchitez de flores y cancro en arboles de manzana (Leeuwen *et al.*, 2000). *M. fructicola* y *M. laxa* solo afectan *Prunus* spp. (Malvárez *et al.*, 2001).

Con base en los trabajos revisados se observó que *M. fructicola* muestra variabilidad en agresividad en frutos dependiendo de las condiciones ambientales, por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar la agresividad de cultivos monospóricos de *M. fructicola* provenientes de diferentes Estados de México sobre frutos de durazno variedad Diamante. Lo anterior permitiría ajustar las estrategias de manejo de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de muestreo

En el año 2008-09 se colectaron en la central de Iztapalapa, México frutos de durazno, de diversos cultivares, provenientes de Aguascalientes, Chihuahua, Michoacán, Morelos y Zacatecas (Fig.1). Una caja de cada Estado con aproximadamente 250 frutos se observó en el laboratorio y se separaron los primeros 10 frutos son síntomas y signos de la pudrición café, de donde se hicieron aislamientos y cultivos monospóricos.



Figura1. Sitios de origen de durazno en México de donde se aisló *M. fructicola*, 2008-2009.

Aislamiento del patógeno

Fragmentos de tejido enfermo o una suspensión de conidios de frutos con síntomas y signos de la pudrición café se colocaron en medio de cultivo Agar-durazno (AD₂).

Fragmentos de frutos de durazno de los estados de Morelos y Michoacán con síntomas de pudrición café se desinfectaron por inmersión con hipoclorito de sodio al 1 % durante un minuto, seguidamente de dos pasos en agua destilada estéril, se retiró la humedad de los fragmentos y se sembraron 4 piezas en cajas de Petri con Agar-Durazno (AD₂, 200 gr durazno, 20 gr Agar en 1000 mL agua destilada). Cuando los aislados esporularon, se realizó una suspensión de conidios con agua destilada estéril en AD₂. Las cajas se incubaron durante 48 h a 23 ± 1 °C. Las colonias fungosas predominantes fueron transferidas a nuevas cajas con AD₂ y se purificaron mediante cultivos monospóricos para realizar pruebas de patogenicidad e identificación molecular. Los cultivos monospóricos fueron conservados en aceite mineral, tiras de papel y en cajas de Petri con medio AD₂.

Diez cultivos monospóricos se conservaron de cada uno de los cinco estados (Tabla 1).

Tabla 1. Cultivos monospóricos de *M. fructicola*, clave asignada, especie identificada, cultivar afectado, procedencia de la muestra, y fecha de aislamiento, 2008-2009.

Cultivo monospórico^z	Especie	Cultivar durazno	Localidad	Fecha aislamiento
MoMo1	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo2	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo3	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo4	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo5	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo6	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo7	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Morelos	12/01/08

MoMo8	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo9	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMo10	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Morelos	12/01/08
MoMi1	<i>M. fructicola</i>	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi2	<i>M. fructicola</i>	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi3	<i>M. fructicola</i>	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi4	<i>M. fructicola</i>	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi5	<i>M. fructicola</i>	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi6	<i>M. fructicola</i>	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi7	<i>M. fructicola</i>	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi8	<i>M. fructicola</i>	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi9	<i>M. fructicola</i>	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoMi10	<i>M. fructicola</i>	Diamante criollo	Michoacán	02/07/08
MoC1	<i>M. fructicola</i>	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC2	<i>M. fructicola</i>	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC3	<i>M. fructicola</i>	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC4	<i>M. fructicola</i>	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC5	<i>M. fructicola</i>	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC6	<i>M. fructicola</i>	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC7	<i>M. fructicola</i>	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC8	<i>M. fructicola</i>	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC9	<i>M. fructicola</i>	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoC10	<i>M. fructicola</i>	Prisco	Chihuahua	02//08/08
MoA1	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA2	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA3	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA4	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA5	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA6	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA7	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA8	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA9	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoA10	<i>M. fructicola</i>	Diamante	Aguascalientes	27/07/08
MoZ1	<i>M. fructicola</i>	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ2	<i>M. fructicola</i>	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ3	<i>M. fructicola</i>	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ4	<i>M. fructicola</i>	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ5	<i>M. fructicola</i>	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ6	<i>M. fructicola</i>	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ7	<i>M. fructicola</i>	Criollo	Zacatecas	26/08/08

MoZ8	<i>M. fructicola</i>	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ9	<i>M. fructicola</i>	Criollo	Zacatecas	26/08/08
MoZ10	<i>M. fructicola</i>	Criollo	Zacatecas	26/08/08

^Z MoMo *Monilinia* aislado de Morelos, MoMi *Monilinia* de Michoacán, MoC *Monilinia* de Chihuahua, MoA *Monilinia* de Aguascalientes y MoZ *Monilinia* de Zacatecas.

Prueba de agresividad de *M. fructicola* sobre durazno

La agresividad de los 50 cultivos monospóricos de *M. fructicola* se evaluó sobre frutos de durazno variedad Diamante que es susceptible a *M. fructicola*. Los frutos inoculados fueron previamente seleccionados por su madurez fisiológica homogénea, lavados en agua corriente, asperjados con etanol al 70 % durante un minuto, y después se retiró etanol con agua destilada estéril. Seis frutos fueron colocados sobre toallas húmedas estériles en charolas individuales de unicel cubiertas con una bolsa de plástico a manera de cámara húmeda.

Un fragmento del cultivo monospórico se transfirió a AD₂ y después de 10 días se elaboró una suspensión de 2.4×10^4 conidios por mL, que se inoculó sobre frutos de durazno variedad Diamante.

Cada cultivo monospórico se inoculó en tres frutos, a los que se les hizo dos punciones de 1mm diámetro y 3 mm profundidad por fruto. En cada punción se introdujeron 480 conidios (20 µL de la suspensión de conidios). Los frutos testigo recibieron 20 µL de agua destilada estéril. La prueba de agresividad se repitió dos veces.

El material inoculado se incubó en cámara húmeda a 23 ± 1 °C, 100% de HR y fotoperíodo de 12 horas luz-oscuridad, durante 6 días. A los 48, 72, 96 y 120 horas después de la inoculación se midió el diámetro de las lesiones; la abundancia de esporulación se evaluó visualmente y se comparo la formación de anillos y la necrosis de la epidermis (Fig. 2). De los frutos inoculados se hicieron reaislamientos que se incubaron a 23 °C para reidentificar a *M. fructicola* y confirmar los Postulados de Koch.

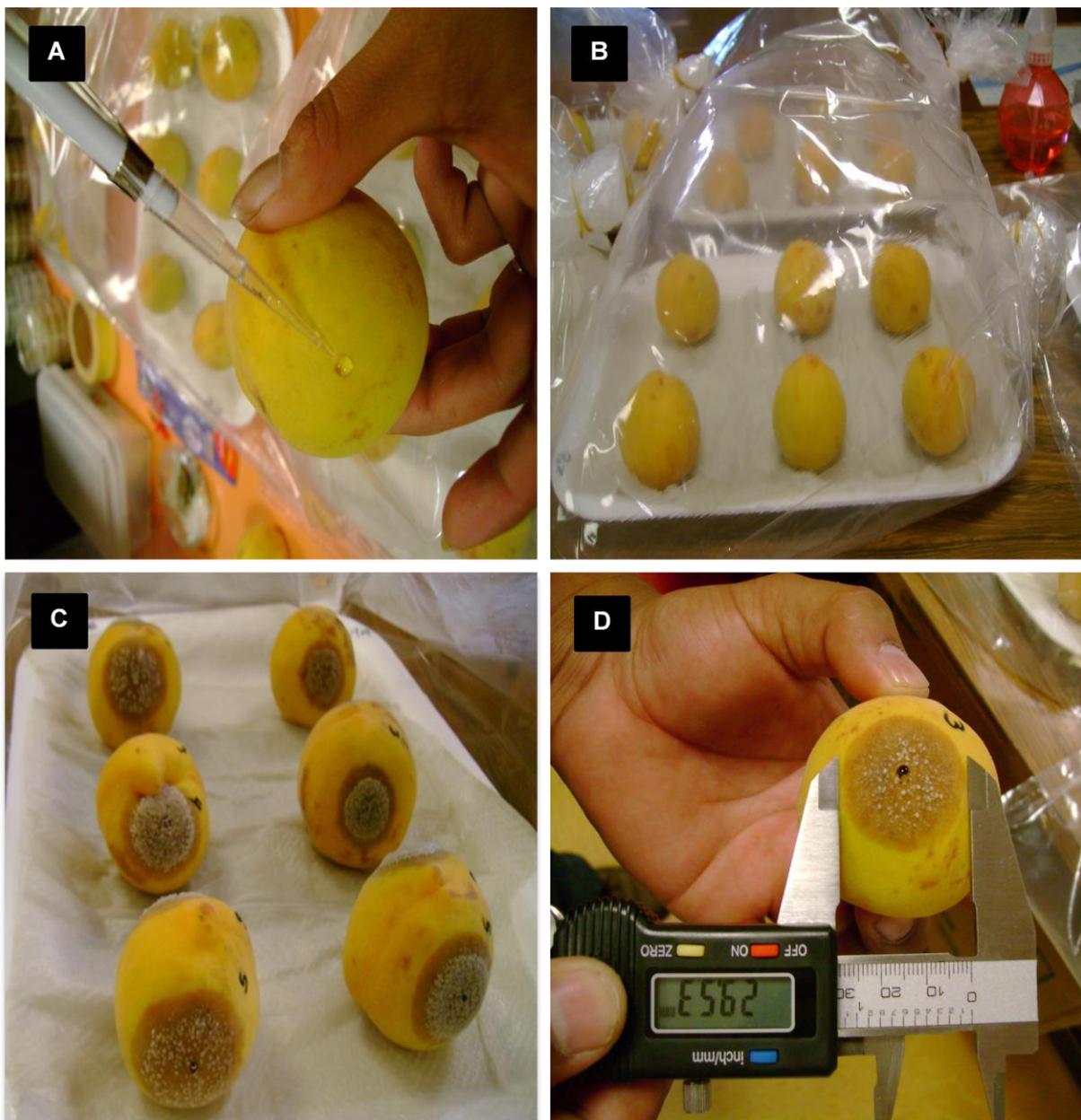


Figura 2. A) Inoculación de frutos de durazno variedad Diamante con *M. fructicola*, B) colocación de frutos en cámara húmeda, C) evaluación de síntomas en frutos inoculados y D) medición del diámetro de lesión, 2009.

La agresividad de los cultivos monospóricos de *M. fructicola* sobre duraznos cv Diamante se evaluó comparando los diámetros de crecimiento a los dos y cinco días ddi. Las medias obtenidas se compararon con una prueba de Tukey ($P=0.05$).

Inoculación en frutos de manzana y pera

Frutos de pera variedad Mantequilla y manzana variedad Golden, se inocularon con un cultivo monospórico de *M. fructicola* de cada Estado. La inoculación por punción y condiciones de incubación fueron similares a la de los duraznos (Fig. 3).

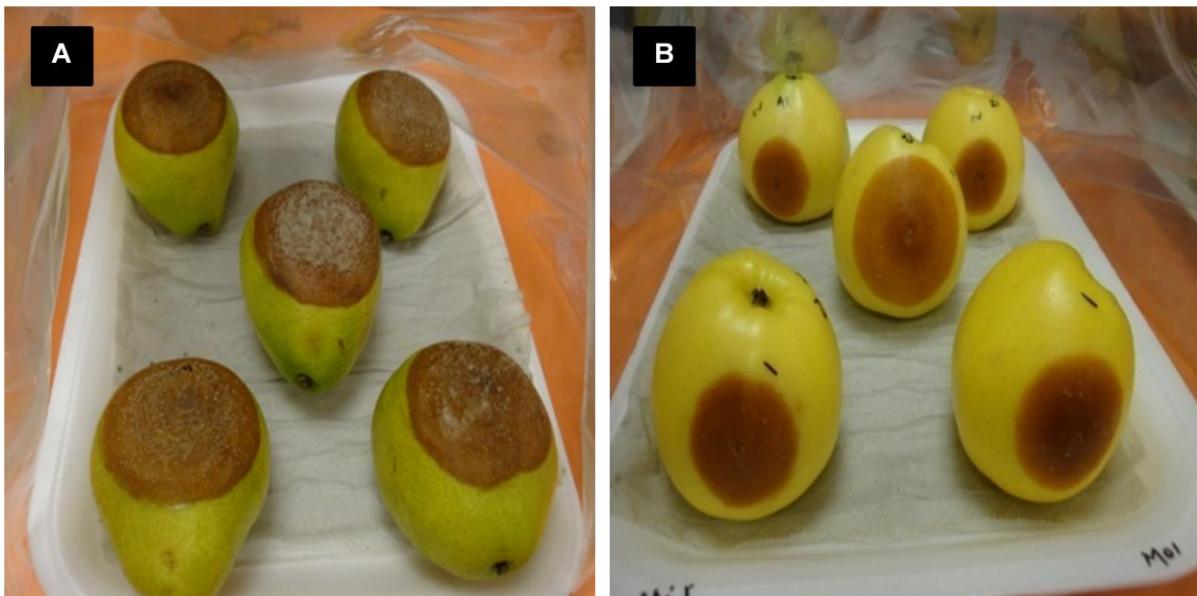


Figura 3. Inoculación de *M. fructicola* en pera variedad Mantequilla A) y manzana variedad Golden B), 2009.

La patogenicidad de los cultivos monospóricos de *M. fructicola* sobre pera y manzana se evaluó comparando los diámetros de crecimiento a los 2 y 8 ddi. El

área bajo la curva de crecimiento de la enfermedad también se midió. Las medias obtenidas se compararon con una prueba de Tukey ($P=0.05$), utilizando el programa SAS System Windows Versión 9.0, 2002.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prueba de agresividad sobre frutos de durazno (Diamante)

Todos los cultivos monospóricos de *M. fructicola* fueron agresivos en los frutos de durazno inoculados. Los frutos manifestaron síntomas típicos de la pudrición café desde las 24 h después de la inoculación. En los frutos se formaron lesiones café, concéntricas con abundante y moderada esporulación alrededor del área inoculada, produciendo una necrosis en la mayoría de los frutos al término del ensayo (Fig. 4); lo cual concordó con (Ogawa 1999 y Fruticultura y Diversificación, 2007).

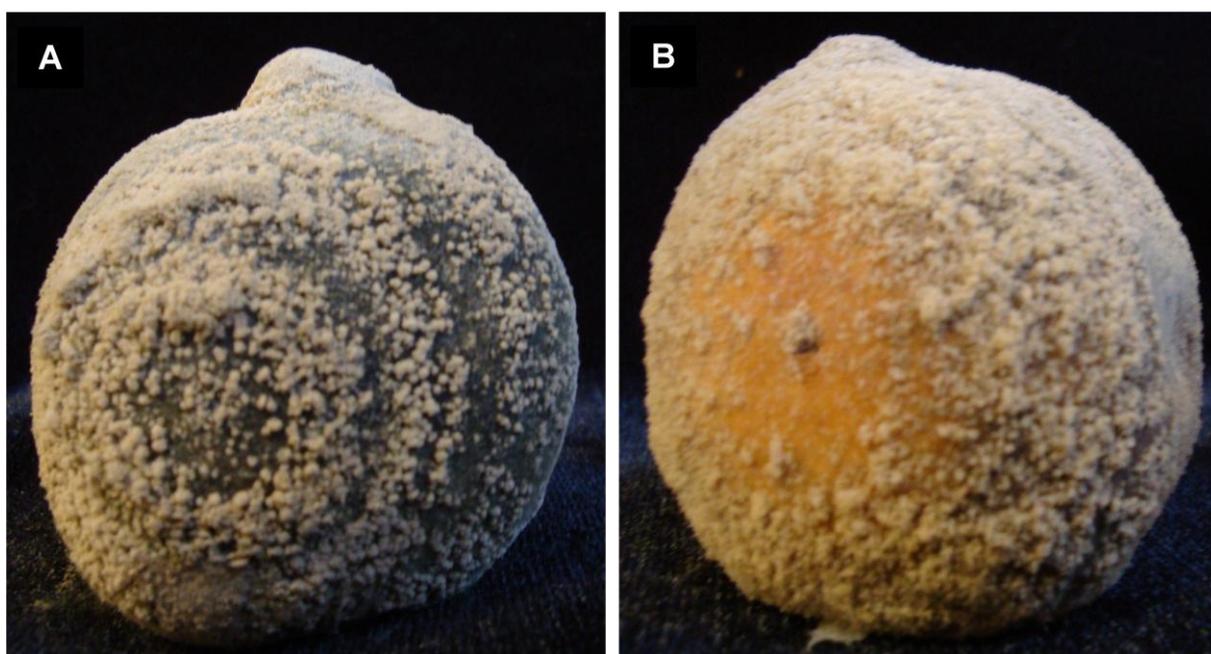


Figura 4. A) Frutos de durazno inoculados con *M. fructicola* mostrando abundante esporulación café concéntrica y necrosis de la epidermis B) moderada esporulación y sin necrosis de la epidermis, a los 10 días después de la inoculación, 2009.

El 82 % de los frutos inoculados presentaron anillos concéntricos, el 62 % mostraron abundante esporulación y el 70 % mostraron necrosis de la epidermis (Tabla 2). La necrosis posiblemente se debe a micotoxinas que aceleran la descomposición del tejido del fruto (Tjasa *et al.*, 2007). Un alto nivel de ácido fenólico en la superficie de

la fruta podría suprimir la producción de cutinasas por *M. fructicola* (Luo y Michailides, 2002). Concentraciones altas de los ácidos clorogénico y fenólicos en la epidermis del fruto se asocian con un alto nivel de resistencia a *M. fructicola* (Bostock *et al.*, 1999). La mayoría de los frutos de durazno inoculados presentaron una severa necrosis y donde no, probablemente fue debido a la presencia de estos ácidos.

Tabla 2. Características morfológicas de 50 cultivos monospóricos de *M. fructicola* inoculados en frutos de durazno a los 11 días y diámetro de lesiones evaluadas a los 2 y 5 días después de la inoculación, 2009.

Cultivo monospórico ^z	Diámetro de lesión (cm)		E ^y	AC ^x	CE ^w
	2 días	5 días			
MoMo4	1.86±0.09	5.43±0.48a	1	1	1
MoC3	2.61±0.18	5.42±0.19a	1	1	0
MoMi4	1.64±0.30	5.41±0.13a	1	1	1
MoA2	1.99±0.14	5.37±0.19a	1	1	1
MoA5	1.19±0.18	5.37±0.26a	0	1	1
MoA6	1.66±0.16	5.37±0.14a	1	1	1
MoC5	1.90±0.09	5.29±0.26a	1	1	1
MoC7	1.55±0.15	5.29±0.26a	0	1	2
MoC9	1.88±0.29	5.25±0.25a	1	1	1
MoC6	1.93±0.16	5.25±0.30a	0	1	2
MoZ4	1.94±0.66	5.25±0.19a	1	0	1
MoZ5	2.14±0.34	5.25±0.21a	1	0	0
MoA9	1.49±0.88	5.25±0.06a	1	0	0
MoMo2	2.16±0.35	5.24±0.15a	1	1	2
MoC10	1.87±0.27	5.23±0.28a	0	0	0
MoA1	1.33±0.29	5.22±0.27a	1	0	0
MoMi6	1.09±0.22	5.18±0.15a	1	1	1
MoMo6	1.80±0.39	5.18±0.13a	0	1	0
MoA7	1.55±0.49	5.17±0.23a	1	1	0
MoMo8	0.95±0.26	5.17±0.12a	1	1	0
MoMi7	1.53±0.51	5.17±0.18a	0	1	2
MoZ1	1.91±0.53	5.17±0.27a	0	1	1
MoZ3	2.14±0.22	5.16±0.25a	1	1	1
MoMo9	1.23±0.56	5.15±0.55a	1	1	1
MoZ8	1.98±0.25	5.09±0.20a	1	1	1
MoMo1	1.81±0.38	5.09±0.24a	0	1	1
MoMo7	1.74±0.63	5.08±0.03a	1	1	1
MoMi8	1.57±0.22	5.08±0.67a	1	1	1
MoMo5	2.31±0.14	5.07±0.10a	0	1	2
MoC1	2.37±0.32	5.06±0.15a	1	1	1
MoZ10	1.18±0.50	5.06±0.52a	0	1	1
MoMi5	1.56±0.26	5.05±0.15a	1	0	0
MoA4	1.26±0.45	5.03±0.59a	0	1	1
MoMi10	1.50±0.46	5.03±0.67a	0	1	1
MoMo3	1.10±0.63	5.02±0.18a	0	1	1
MoC4	2.51±0.27	4.98±0.19ab	0	1	1
MoA3	1.98±0.29	4.97±0.27ab	0	1	1
MoA8	1.71±0.19	4.95±0.22ab	1	1	1
MoZ2	2.26±0.22	4.94±0.12ab	1	0	1

MoC2	0.79±0.35	4.92±0.12ab	1	1	0
MoMi9	1.39±0.68	4.91±0.77ab	0	1	1
MoMo10	2.12±0.17	4.80±1.28ab	1	1	1
MoMi1	1.30±0.39	4.70±0.80ab	1	0	1
MoZ6	0.82±0.60	4.57±0.38abc	1	1	1
MoA10	1.18±0.13	4.56±0.23abc	1	1	1
MoMi3	1.82±0.19	4.53±0.56abc	0	0	1
MoZ7	1.82±1.11	4.44±1.23abc	0	1	1
MoC8	1.26±0.30	4.27±1.11abc	0	1	1
MoZ9	1.50±0.56	3.76±1.63 bc	1	1	1
MoMi2	0.66±0.01	3.33±1.56 c	1	1	1

^Z MoMo *Monilinia* aislado de Morelos, MoMi *Monilinia* de Michoacán, MoC *Monilinia* de Chihuahua, MoA *Monilinia* de Aguascalientes y MoZ *Monilinia* de Zacatecas.

^Y Esporulaci3n (E). 0 esporulaci3n moderada; 1 esporulaci3n abundante.

^X Anillos de crecimiento (AC). 0 ausencia; 1 presencia.

^W Necrosis de la epidermis (CE). 0 ausente; 1 presente; 2=necrosis parcial.

La agresividad de los 50 cultivos monosp3ricos inoculados sobre los frutos de durazno fue variable (Tabla 2 y Fig. 5). Los cultivos monosp3ricos m1s agresivos fueron MoC3 con un di1metro de lesi3n de 2.61 cm a los 2 ddi y el MoMo4 con 5.43 cm a los 5 ddi, mientras que el monosp3rico MoMi2 fue el menos agresivo en ambas fechas de evaluaci3n. Hubo cultivos monosp3ricos, como el MoC4 con un di1metro de lesi3n 2.51 cm a los 2 ddi y que a los 5 ddi el tama1o de la lesi3n incremento escasamente con 4.98 cm.

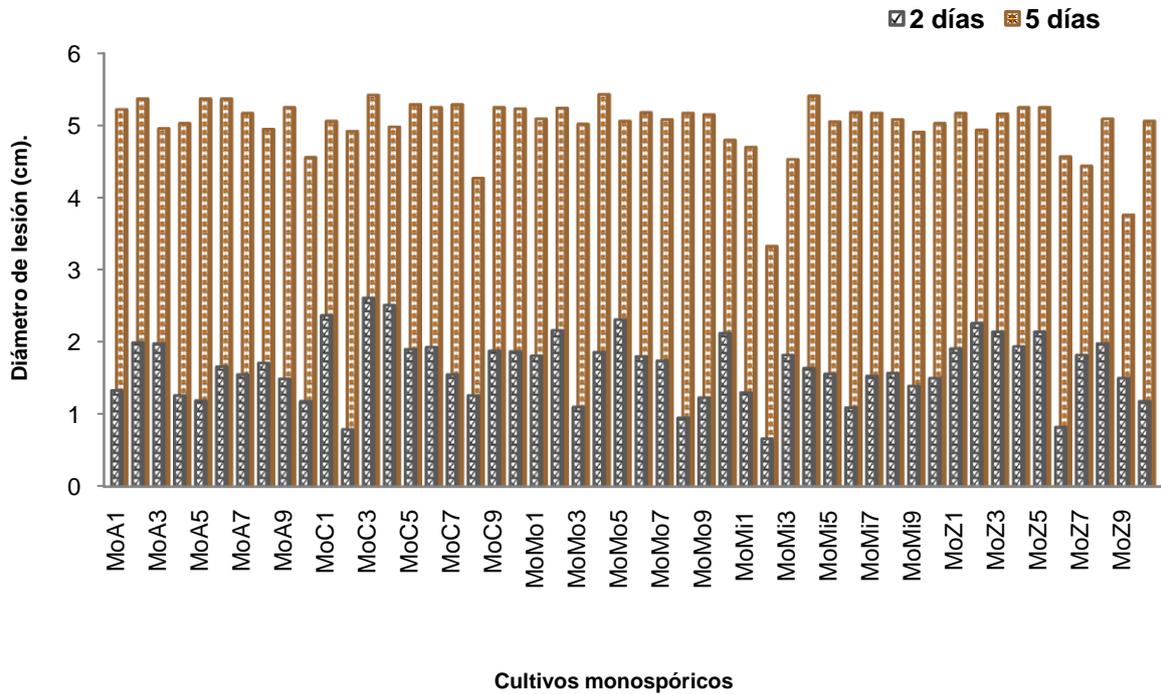


Figura 5. Agresividad de los cultivos monospóricos de *M. fructicola* inoculados sobre frutos de durazno variedad Diamante a los 2 y 5 días después de la inoculación, 2009. Destacan el MoMo4 por su rápido crecimiento y el MoMi2 por su lento crecimiento a los 5 ddi.

Los resultados anteriores muestran que los cultivos monospóricos de *M. fructicola* obtenidos de durazno, difieren en su capacidad para dañar frutos de durazno del cultivar Diamante, con base en el tamaño de las lesiones provocadas sobre los frutos.

Considerando el diámetro de lesión producido por los 50 cultivos monospóricos de *M. fructicola* a los 2 días, fue posible agruparlos en altamente, moderadamente y menos agresivos. Esto se realizó transformando a porcentaje el diámetro de las lesiones causadas por los cultivos monospóricos en cada fecha de evaluación. El cultivo que mostró el máximo valor de diámetro de lesión en la evaluación fue MoC3

y se le asignó el 100 % y al resto de los cultivos monospóricos se les asignó un porcentaje con base a su valor (Fig. 6).

De esta forma cultivos monospóricos que mostraron diámetros de lesión mayor del 81.2 % fueron considerados como altamente agresivos, entre 76.24 y 41.76 % moderadamente agresivos y diámetros menores de 36.3 % como menos agresivos (Fig. 6).

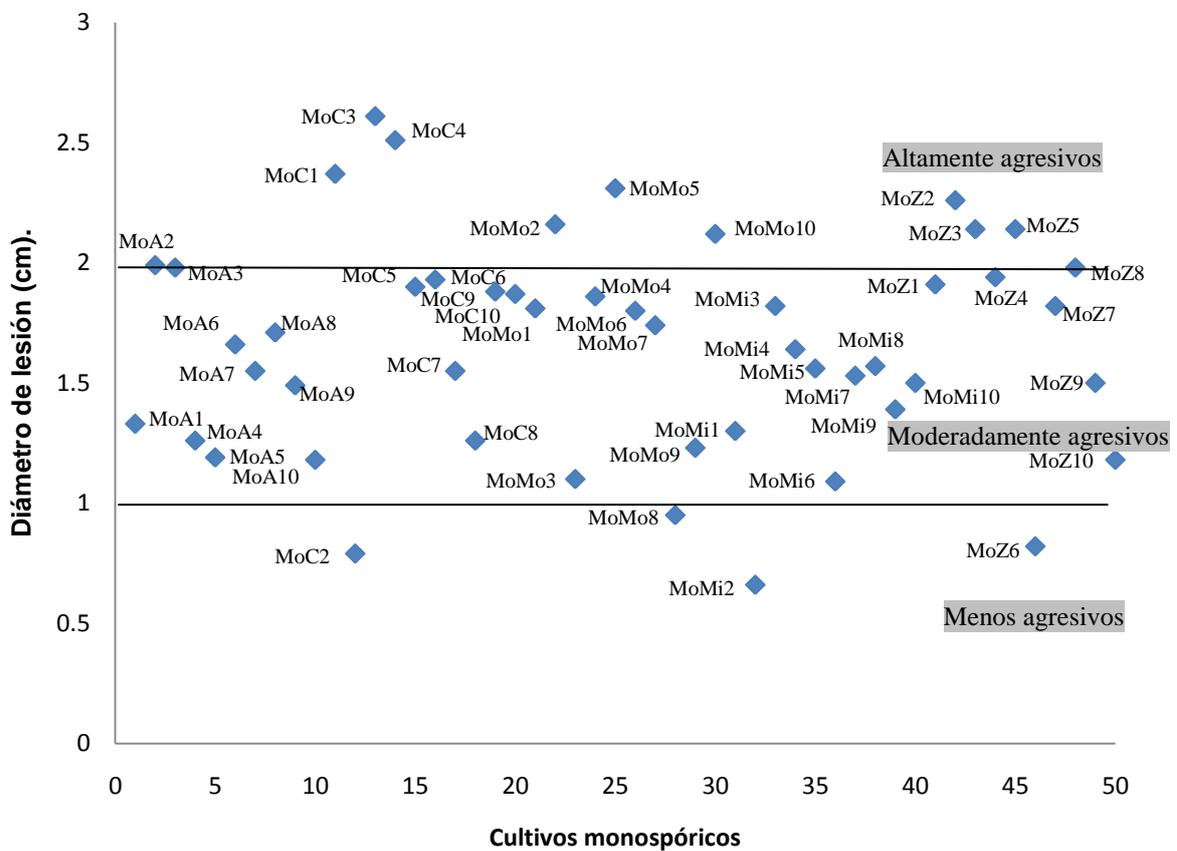


Figura 6. Grado de agresividad de 50 cultivos monospóricos de *M. fructicola* obtenidos de frutos de durazno provenientes de los Estados de Chihuahua (MoC), Morelos (MoMo), Aguascalientes (MoA), Michoacán (MoMi), Zacatecas (MoZ) a los 2 días después de la inoculación sobre frutos de durazno, 2009.

El 18 % de los cultivos monospóricos a los 2 ddi causaron una lesión de mayor diámetro y fueron considerados como altamente agresivos, sobresaliendo el MoC3,

el 74% de los cultivos monospóricos fueron considerados moderadamente agresivos y los cultivos monospóricos MoC2, MoMo8, MoMi2 y MoZ6 con 8 % fueron considerados como los menos agresivos debido a que causaron menor diámetro de lesión (Fig. 5). Todos los frutos testigo permanecieron asintomáticos y no se observó ningún síntoma asociado con la pudrición café.

Las diferencias en agresividad de los cultivos monospóricos no fue significativa ($P=0.05$) entre los cinco Estados de origen, ni a los 2 ni a los 5 ddi (Tabla 3).

Tabla 3. Diámetros de lesión causados en frutos de durazno por los cultivos monospóricos de *M. fructicola* provenientes de cinco Estados a los 2 y 5 días después de la inoculación.

Estado	Crecimiento (cm) a los 2 días	Crecimiento (cm) a los 5 días
Chihuahua	1.86a	5.09a
Zacatecas	1.76a	4.86a
Morelos	1.70a	5.12a
Aguascalientes	1.53a	5.12a
Michoacán	1.40a	4.83a

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P=0.05$).

Se cumplieron los postulados de Koch, lo que ratificó a *M. fructicola* como el agente causal de la pudrición café.

Inoculación en frutos de manzana y pera

Se demostró la patogenicidad de los cultivos monospóricos de *M. fructicola* al ser inoculados sobre frutos de manzana y pera en las cuales está demostrado que son susceptibles por la especie *Monilinia fructigena*, que en este caso demostraron ser susceptible a *M. fructicola*.

Los frutos de pera y manzana inoculados manifestaron síntomas típicos de la pudrición café desde los 2 ddi. Los frutos presentaron manchas circulares color café, con esporulación agrupada de esporodoquios distribuidos aleatoriamente en manzana, mientras que en pera los esporodoquios, en mayor concentración, se distribuyeron en anillos concéntricos (Fig. 7). Estos síntomas coincidieron con los registrados por Plantpro (2009), Muños *et al.* (2008) y Mackie *et al.* (2005). *Monilia laxa* también causa pudrición en frutos de manzana bajo condiciones de atmosferas controladas Briceño (2006). Corbin (1963) citado por Leeuwen *et al.* (2000) y Bannon *et al.* (2008) mencionaron la importancia de heridas, como requisito para la infección por *M. fructigena* en frutas de pepita; lo cual coincide con nuestros resultados con *M. fructicola* en manzanas y peras inoculadas con heridas.

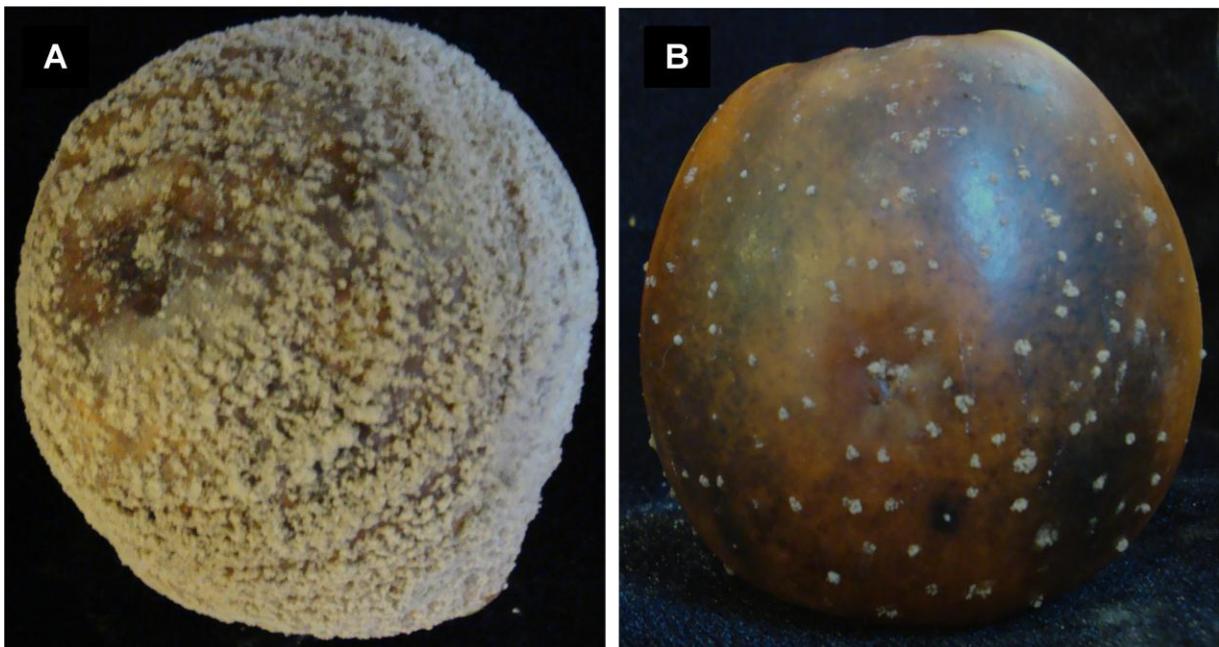


Figura 7. A) Abundante esporulación café, concéntrica y necrosis de la epidermis en pera inoculada con *M. fructicola* y B) esporodoquios distribuidos aleatoriamente y necrosis en manzana, a los 10 días después de la inoculación, 2009.

Van Leeuwen *et al.* (2000) encontraron que manzanas sin lesiones no se infectaron con *M. fructigena* a pesar de haberse inoculado con una alta concentración de

conidios e incubado a 16 - 18 ° C y 90 – 100 % de HR, durante 7 - 10 días. Balla y Holb (2007) mencionaron que las pérdidas de frutas de manzana dependen de las condiciones de almacenamiento y sanidad de los frutos almacenados; la decadencia de la fruta sin heridas fue significativamente menor en comparación con fruta heridas y en contacto con un fruto infectado con *M. fructigena*. Durazno, manzana, pera, membrillo, ciruela, cereza, y nectarino son hospedantes de *M. fructigena* (Mackie *et al.*, 2005).

La agresividad de *M. fructicola* a los 8 ddi fue significativamente mayor en pera que en manzana ($P=0.05$). MoC1 fue el más agresivo con una media de 5.67 unidades bajo la curva de crecimiento (UBC) en frutos de pera y 4.66 UBC en manzana; mientras que el MoA1 fue el menos agresivo, con una media de 5.14 UBC en frutos de pera y 2.25 UBC en frutos de manzana. Las diferencias en agresividad entre cultivos monospóricos de cada Estado fueron significativas ($P=0.05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Diámetros de lesión en unidades bajo la curva de crecimiento (UBC) obtenidos de la inoculación de cultivos monospóricos de *M. fructicola* provenientes de cinco Estados sobre frutos de pera y manzana a los 8 días de la inoculación.

Cultivos monospóricos ^Z	Pera	Manzana
MoC1	5.67a	4.66a
MoZ1	5.47ab	3.47b
MoMi1	5.39b	3.11b
MoMo1	5.38bc	3.50b
MoA1	5.14c	2.25c

Medias seguidas con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P=0.05$).

^Z MoMo=*Monilinia* aislado de Morelos, MoMi=*Monilinia* de Michoacán, MoC=*Monilinia* de Chihuahua, MoA=*Monilinia* de Aguascalientes y MoZ=*Monilinia* de Zacatecas.

A mayor tiempo de incubación *M. fructicola* provocó un diámetro de lesión significativamente mayor en pera y manzana ($P=0.05$) y también se mantuvo la agresividad en pera con una media promedio de 5.41 UBC que fue estadísticamente superior ($P=0.05$) a la de manzana (3.39 UBC) (Tabla 5).

Tabla 5. Agresividad de cultivos monospóricos de *M. fructicola* y su relación con días de incubación sobre frutos inoculados de pera y manzana.

Días	Pera	Manzana
3	2.42e	0.92f
4	3.89d	1.87e
5	5.33c	2.98d
6	6.42b	3.95c
7	7.09a	4.92b
8	7.32a	5.74a
Media ^z	5.41a	3.39b

Medias seguidas con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P=0.05$).

^z Para el caso de la media general de poblaciones la media se obtuvo por fila, por una prueba de t con muestras emparejadas ($P=0.05$).

La agresividad de *M. fructicola* a los tres días en pera (Tabla 5) fue similar a la registrada por Muños *et al.*, (2007) con *M. fructigena* y *M. laxa* en manzana.

Las diferencias en agresividad entre los cultivos monospóricos de los cinco Estados también se midió con base en el área bajo la curva del progreso de la enfermedad. El monospórico del Estado de Chihuahua (MoC1) en manzana, a los 8 ddi, fue el más agresivo con 28.01 unidades bajo la curva acumulado (UBCA) comparado con el menos agresivo, Aguascalientes (MoA1) con 13.51 UBCA (Fig. 8 y Tabla 6). *M. fructicola* fue más agresivo en pera que en manzana (Tabla 6). Todos los frutos testigo permanecieron asintomáticos.

Agresividad de *M. fructicola* en manzana.

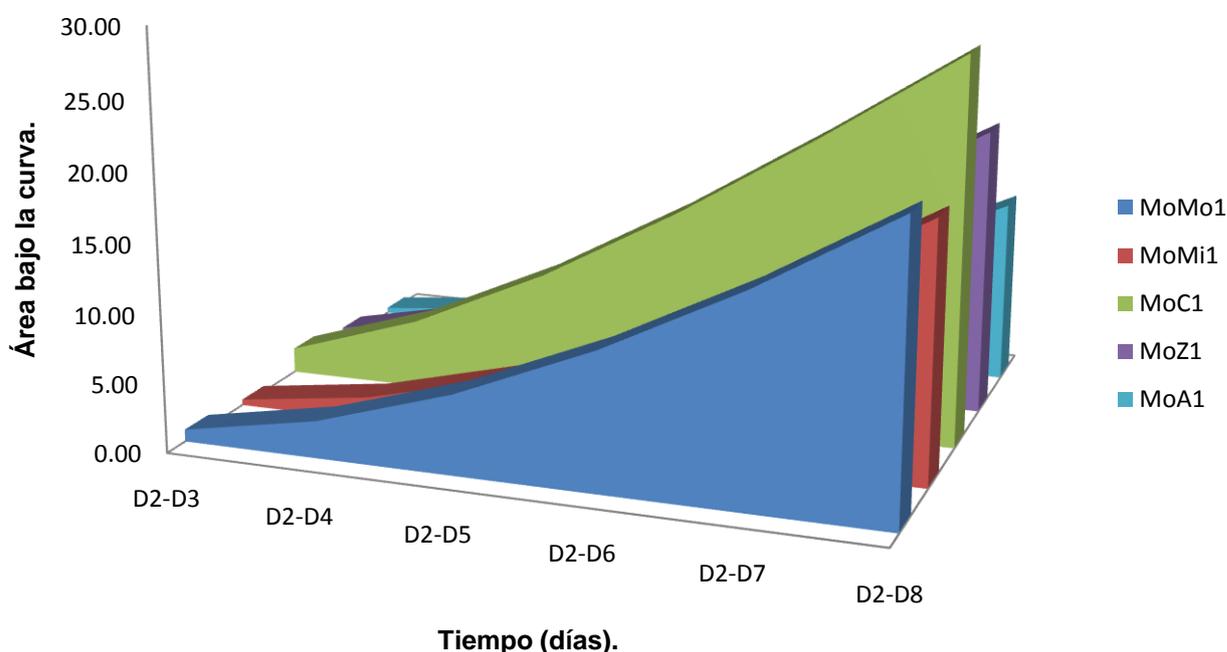


Figura 8. Agresividad acumulada de cinco cultivos monospóricos de *M. fructicola* provenientes de cinco Estados Morelos (MoMo), Michoacán (MoMi), Chihuahua (MoC), Zacatecas (MoZ) y Aguascalientes (MoA,) inoculados en frutos de manzana del día 2 al día 8 después de la inoculación, evaluada con base en el Área bajo la curva de los diámetros de lesión.

Tabla 6. Crecimiento acumulado de cinco cultivos monospóricos de *M. fructicola* provenientes de cinco Estados (Morelos, Michoacán, Chihuahua, Zacatecas, Aguascalientes) inoculados en frutos de pera y manzana en 6 periodos de incubación del día 2 (D2) al día 8 (D8) después de la inoculación, evaluado con base en el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de los diámetros de la lesión.

Cultivo monospórico ^Z	ABCPE1	ABCPE2	ABCPE3	ABCPE4	ABCPE5	ABCPE6
Pera	D2-D3	D2-D4	D2-D5	D-D6	D2-D7	D2-D8
MoMo1	2.27	6.07	11.33	17.69	24.84	32.33
MoMi1	2.42	6.25	11.56	18.06	25.18	32.36
MoC1	2.76	6.97	12.56	19.20	26.49	34.02
MoZ1	2.70	6.83	12.29	18.71	25.68	32.84
MoA1	1.98	5.46	10.49	16.67	23.63	30.88
Manzana						
MoMo1	0.87	2.71	5.80	9.98	15.10	21.01

MoMi1	0.42	1.76	4.27	7.97	12.89	18.70
MoC1	1.85	5.06	9.63	15.19	21.41	28.01
MoZ1	1.08	3.14	6.28	10.31	15.22	20.87
MoA1	0.40	1.34	2.99	5.29	8.74	13.51

^z MoMo=*Monilinia* aislado de Morelos, MoMi=*Monilinia* de Michoacán, MoC=*Monilinia* de Chihuahua, MoA=*Monilinia* de Aguascalientes y MoZ=*Monilinia* de Zacatecas.

Esta información confirma a *Monilinia fructicola* como patógeno de la pudrición café del durazno en México; hay un solo registro previo en durazno en México (Santiago *et al.*, 2007 XXXV Congreso Nacional de Fitopatología, Monterrey N.L, México) y en manzano y pera en Checoslovaquia por Duchoslavova *et al.* (2008).

CONCLUSIONES

Los 50 cultivos monospóricos de *M. fructicola* inoculados en durazno, pera y manzana fueron patogénicos y agresivos. Con el tiempo los frutos se tornaron necróticos, presentaron anillos concéntricos de esporulación abundante en durazno y pera al incrementarse la madurez de los frutos, pero en frutos de manzana se presento esporulación agrupada de esporodoquios distribuidos aleatoriamente.

LITERATURA CITADA

- Agrios, N.G. 2002. Fitopatología. Ed. Limusa. México. 838 p.
- Balla, B., and Holb, I. 2007. Effect of three storage methods on fruit decay and brown rot of apple. Department of Horticulture and Plant Biotechnology, 13: 55–57
- Bannon, F., Gort, G., Holb, I., Jeger, M.J. 2008. Diurnal Patterns in dispersal of *Monilinia fructigena* conidia in an apple orchard in relation to weather factors.
- Biggs, A. R., and Northover, J. 1985. Inoculum sources for *Monilinia fructicola* in Ontario peach orchards. Plant Pathol. 7:302-307.
- Bostock, R. M., Wilcox, S. M., Wang, G., and Adaskaveg, J. E. 1999. Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. Plant Pathol. 54:37-50.
- Briceño, E.; Latorre, B. 2006. Determinación de *Monilia laxa* afectando manzanas cv. Fuji en Chile. XVI Congreso Nacional de Fitopatología. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Corbin, J. B. 1963. Factors determining the length of the incubation period of *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey in fruits of *Prunus* spp. Aust. J. Agric. Res. 14:51-60.
- Duchoslavová, J., Širučková, I., Zapletalová, E., Navrátil, M., and Šafářová, D. 2008. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on various stone on pome fruits in the Czech Republic. Plant Disease 91: p 907.
- Fruticultura y Diversificación, 2007. *Monilinia*. Un problema para la expiración de frutas de corozo argentinas. 25 p.
- Hong, C. X., Holtz, B. A., Morgan, D. P., and Michailides, T. J. 1997. Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. Plant Dis. 81:519-524.
- Hong, C. X., Holtz, B. A., Morgan, D. P., and Michailides, T. J. 1997. Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. Plant Dis. 81:519-524.
- Holtz, B. A., Michailides, T. J., and Kölliker, R. 1995. Thinned infected stone fruit as inoculum sources of *Monilinia fructicola* in California. (Abstr.) Phytopathology 85:S1194.
- Ibbotson-Darhower, H., Hickey, K. D., and Travis, J. W. 1998. Susceptibility of peach and nectarine fruit at different developmental stages to *Monilinia fructicola*. Phytopathology 88:S130.

- Jenkins, P. T. 1965. The dispersal of conidia of *Sclerotinia fructicola* (Wint.) Rehm. Aust. J. Agric. Res. 16:627-633.
- Landgraf, F. A., and Zehr, E. I. 1982. Inoculum sources for *Monilinia fructicola* in South Carolina peach orchards. Phytopathology 72:185-190.
- Luo, Y., and Michailides, T. J. 2001. Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. Plant Pathology 91:864-872.
- Luo, Y., Michailides, T. J., Morgan, D. P., Krueger, W. H., and Buchner, R. P. 2002. Dynamics of inoculum potential of *Monilinia fructicola* in relation to cultural practices in prune orchards. Phytopathology 92:S49.
- Luo, Y., and Michailides, T. J. 2003. Threshold conditions that lead latent infection to prune fruit rot caused by *Monilinia fructicola*. Phytopathology 93:102-111.
- Mackie, A., South P., Nuccia E., and Satendra K. 2005. Brown rot *Monilinia fructigena*. The State of Western Australia. Plant Pathologist.181:1833-7694.
- 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 iniciadores específicos. Agrociencia 5:48-53.
- Michailides, T. J., and Morgan, D. P. 1997. Influence of fruit-to-fruit contact on the susceptibility of french prune to infection by *Monilinia fructicola*. Plant Dis. 81:1416-1424.
- Mondino P., E. Pérez, V. Gepp y S. García, 1997. Detección de infecciones latentes de *Monilinia* spp. sobre frutos verdes de duraznero. Trabajo presentado al XXX Congreso Brasileiro de Fitopatología.
- Muñoz, Z., Moret, A., y Bech, J. 2008. Morfological y molecular characterization of *Monilinia* sp. isolates and pathogenicity on apple. Agrociencia. 42: 119-128.
- Northover, J., and Cerkauskas, R. F. 1994. Detection and significance of symptomless latent infections of *Monilinia fructicola* in plums. Plant Pathol. 16:30-36.
- Northover, J., and Biggs, A. R. 1995. Effect of conidial concentration of *Monilinia fructicola* on brown rot development in detached cherries. Plant Pathol. 17:205-214.
- Ogawa, J. M. and English H. 1991. Disease of Temperature Zone Tree Fruit and Nut Crops. Publ. 3345. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, 461p.
- Ogawa, J. M., Zehr, E. I., George, W. B., Ritchie, F. D., Kiyoto, U., y Uyemoto, J.K. 1999. Plagas y enfermedades de los frutales de hueso. La Sociedad Americana de Fitopatología. 105p.

- Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu.Rev. Phytopathol.* 34:413–434.
- Plantpro, 2009. Cáncer de cuello de los manzanos. http://www.plantprotection.hu/modulok/spanyol/apple/canker_app.htm.
- Phillips, D.J. 1984. Effect of temperature on *Monilinia fructicola* conidia produced on fresh stone fruit. *Plant Disease* 68:610-612.
- Phillips, D.J., Margosan, D.A., y Mackey, B.E. 1989. Volume, nuclear number, and aggressiveness of conidia of *Monilinia fructicola* produced on media of varied glucose concentrations at 15 and 25 °C. *Phytopathology* 79:401-403.
- Silvera, E., Mondino, P., Malvárez, G., Silveira, A., Rodríguez, A., Burgueño, J., y Aguilar, C. 2004. *Monilinia fructicola*, única especie presente ocasionando la podredumbre morena del duraznero (*Prunus persica*) en Uruguay. *Fitopatología*, 39:126-132.
- Tjaša, G., Branka, J., Alenka, M., Franci, C and Jernej, J. 2007. Intraspecific variability in the phytopathogenic *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey. Department of Agronomy pp. 295-299.
- Van Leeuwen, G.C.M., Stein, A., Holb, I.J., Jeger, M.J., 2000. Yield loss in apple caused by *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey, and spatio-temporal dynamics of disease development. *European Journal of Plant Pathology* 106:519–528.

CONCLUSIONES GENERALES

El hongo causante de la pudrición café en los Estados de Aguascalientes, Chihuahua, Michoacán, Morelos y Zacatecas fue *Monilinia fructicola*, con base morfológica y molecular.

Monilinia creció un 100 % más rápido en AD₂ que en PDA a los 7 días.

M. fructicola, expresó una mayor variabilidad morfológica en PDA.

La morfología de los cultivos monospóricos provenientes de los cinco Estados fue similar.

Los 50 cultivos monospóricos de *M. fructicola* inoculados en durazno, pera y manzana fueron patogénicos y agresivos.

La agresividad en frutos de durazno inoculados fue independiente del lugar de origen de los cultivos monospóricos y del crecimiento morfológico de la colonia en medios de cultivo.

Con el tiempo los frutos inoculados se tornaron necróticos, presentaron anillos concéntricos de esporulación en durazno y pera al incrementarse la madurez de los frutos.