

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Identificación molecular de especies de *Monilinia spp.* que afectan la  
producción de durazno, *Prunus persica*, en las provincias de Carchi,  
Imbabura, Pichincha y Tungurahua

Cristina Alexandra Salgado Torres

Proyecto Final presentado como requisito para la obtención del título  
de Licenciatura en Biotecnología.

Quito

Mayo de 2011

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Identificación molecular de especies de *Monilinia spp.* que afectan la producción de durazno, *Prunus persica*, en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua.**

**Cristina Alexandra Salgado Torres**

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Directora y Miembro del Comité

-----

Venancio Arahana, Ph.D.

Miembro del Comité

-----

José Tobar, Msc.

Miembro del Comité

-----

Stella de la Torre, Ph. D.

Decana del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

-----

Quito, Mayo del 2011

**DERECHOS DE AUTOR**

© Derechos de Autor

Cristina Alexandra Salgado Torres

2011

## **Dedicatoria**

Este trabajo es un merecido reconocimiento al esfuerzo de mis padres y al apoyo incondicional de mi hermano.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a María de Lourdes Torres y Venancio Arahana por haberme permitido realizar este proyecto, a Diana Ayala, Nicolás Bastidas y Estefanía Borja por haberme guiado técnicamente en varios momentos a lo largo de este estudio y a mis compañeros de laboratorio con los que compartí muchas experiencias durante todo este tiempo.

## Resumen

El cultivo de durazno, *Prunus persica*, en el Ecuador se ve afectado por una enfermedad fúngica denominada podredumbre morena o parda, producida por *Monilinia spp.* La infección causada por este fitopatógeno es uno de los factores que ha limitado el rendimiento en los cultivos de durazno nacionales, produciendo pérdidas mayores al 50%.

El objetivo de este estudio fue identificar las especies de *Monilinia* que afecta los cultivos de durazno en 4 provincias productoras del país: Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua. Para esto fue necesario aislar el hongo de duraznos que presentaban la sintomatología de la enfermedad obteniéndose un total de 21 muestras mediante análisis morfológico (coloración de micelio y forma de esporas). La identificación molecular fue realizada mediante reacciones de PCR usando 3 pares de primers que amplifican la región ITS de cada especie y confirmada a través del PCR múltiple usando primers tipo SCAR. Los resultados revelaron que de las 21 muestras analizadas, solo 11 correspondieron al género *Monilinia*, específicamente a la especie *M. fructicola*. Adicionalmente, en este estudio se comprobó que la metodología más eficiente para la identificación de especies de *Monilinia* es el PCR múltiple, por ser un método de detección rápido para este fitopatógeno.

Esta investigación propone una metodología eficiente para la identificación de especies de *Monilinia*, lo cual tienen usos potenciales en estudios de diagnóstico y epidemiología de éste y otros patógenos que afectan frutales en el país.

## Abstract

The peach, *Prunus persica*, is affected by a fungal disease known as brown rot, produced by *Monilinia spp.* The infection caused by this phytopathogen is one of the limiting factors of the national peach production, causing a yield decrease that can reach more than 50%.

The aim of this research was to identify the species of *Monilinia* present in 4 Ecuadorian provinces: Carchi, Imbabura, Pichincha and Tungurahua. For this purpose, the fungus was isolated from peach fruits presenting the typical disease symptoms and 21 samples were identified by morphological analysis (mycelium stain and spore shape). The molecular determination was performed by PCR using 3 different ITS primers and by a multiplex PCR using SCAR primers specific for *Monilinia*. The results showed that out of 21 analyzed samples, only 11 belong to the genus *Monilinia*, specifically to the species *M. fructicola*. Additionally, this study showed that the multiplex PCR was the most efficient method to identify *Monilinia* species, because is faster than the single PCR.

This research proposes an efficient methodology for the identification of *Monilinia spp.*, which has potential applications in diagnosis and epidemiology studies of this pathogen and for other fungi affecting fruit crops in Ecuador.

## TABLA DE CONTENIDOS

1.	<b>Introducción</b> .....	1
1.1.	<i>Prunus persica</i> .....	1
1.1.1.	Origen y descripción de <i>Prunus persica</i> .....	1
1.1.2.	Importancia económica de <i>Prunus persica</i> a nivel mundial.....	2
1.1.3.	Producción de <i>Prunus persica</i> en el Ecuador .....	2
1.1.4.	Enfermedades de durazno en el Ecuador .....	3
1.2.	Infección de Podredumbre Morena causada por <i>Monilinia spp.</i> .....	4
1.2.1.	Taxonomía de <i>Monilinia spp.</i> .....	4
1.2.2.	Ciclo de infección y epidemiología de <i>Monilinia spp.</i> .....	5
1.2.3.	Distribución de <i>Monilinia spp.</i> a nivel mundial .....	6
1.3.	Control de <i>Monilinia spp.</i> .....	7
1.3.1.	Control químico .....	7
1.3.2.	Control biológico .....	8
1.4.	Marcadores Genéticos .....	8
1.4.1.	Formas de identificación de especies de <i>Monilinia spp.</i> .....	9
1.4.2.	Regiones ITS .....	10
1.4.3.	Marcadores SCAR .....	11
2.	<b>Objetivo General</b> .....	11
3.	<b>Objetivos Específicos</b> .....	12
4.	<b>Área de Estudio</b> .....	12
5.	<b>Justificación</b> .....	12
6.	<b>Materiales</b> .....	14
6.1.	Colección de duraznos infectados .....	14
6.2.	Aislamiento de <i>Monilinia spp.</i> a partir de frutos infectados.....	14
6.3.	Caracterización morfológica de los hongos aislados de frutos de durazno infectados. 14	
6.4.	Cultivos monospóricos de <i>Monilinia spp.</i> .....	15
6.5.	Cultivo de micelio y extracción de ADN de hongo .....	15
6.6.	Cuantificación de ADN extraído a partir de micelio del hongo .....	16
6.7.	Amplificación de regiones ITS .....	16
6.8.	PCR múltiple usando primers tipo SCAR .....	16
6.9.	Electroforesis en gel de Agarosa.....	17



7.	<b>Métodos</b> .....	17
7.1.	Desinfección de frutos infectados y aislamiento de <i>Monilinia</i> .....	17
7.2.	Aislamiento de <i>Monilinia</i> a partir de frutos momificados.....	18
7.3.	Identificación morfológica de <i>Monilinia spp.</i> .....	19
7.4.	Cultivos monospóricos de muestras identificadas morfológicamente como <i>Monilinia spp.</i> .....	20
7.5.	Extracción de ADN del hongo a partir de micelio .....	21
7.6.	Protocolo de amplificación de regiones ITS.....	22
7.7.	Protocolo de amplificación de ADN mediante PCR múltiple, usando primers tipo SCAR .....	23
7.8.	Electroforesis en gel de Agarosa.....	24
8.	<b>Resultados</b> .....	24
8.1.	Colección de frutos de durazno infectados y aislamiento de <i>Monilinia spp.</i> .....	24
8.2.	Características morfológicas de los aislamientos de hongo .....	25
8.3.	Cultivos monospóricos de los aislamientos de hongo.....	26
8.4.	Extracción y cuantificación ADN de <i>Monilinia spp.</i> .....	26
8.5.	Amplificación de regiones ITS .....	27
8.6.	Amplificación con primers tipo SCAR .....	27
9.	<b>Discusión</b> .....	28
9.1.	Colección de frutos infectados y aislamiento de <i>Monilinia spp.</i> .....	28
9.2.	Identificación morfológica de <i>Monilinia spp.</i> .....	30
9.3.	Identificación molecular de especies de <i>Monilinia spp.</i> .....	31
10.	<b>Conclusiones</b> .....	33
11.	<b>Recomendaciones</b> .....	34
12.	<b>Bibliografía</b> .....	35
13.	<b>Tablas</b> .....	38
14.	<b>Figuras</b> .....	42
15.	<b>Anexos</b> .....	48

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.-</b> Frutos de durazno colectados en cuatro provincias de la sierra ecuatoriana. ....	38
<b>Tabla 2.-</b> Set de primers utilizados para amplificación de regiones ITS.....	39
<b>Tabla 3.-</b> Set de primers utilizados para el PCR múltiple con primers tipo SCAR .....	39
<b>Tabla 4.-</b> Comparación de características morfológicas usadas para la identificación de especies de <i>Monilinia</i> en medio PDA. Tomado de EPP0, 2009. ....	40
<b>Tabla 5.-</b> Cuantificación de ADN extraído en las 21 muestras analizadas molecularmente ..	40
<b>Tabla 6.-</b> Aislamientos identificados como <i>M. fructicola</i> después de realizar los análisis moleculares correspondientes, usando primers ITS y SCAR. ....	41
<b>Figura 1.-</b> Fases sexuales y asexuales de <i>Monilinia spp.</i> dentro del ciclo de infección de Podredumbre Morena. Tomado de Agrios, 1995.....	42
<b>Figura 2.-</b> Desarrollo de sintomatología y momificación de fruto. A: Fruto de durazno atizonado. B: Fruto de durazno momificado.....	43
<b>Figura 3.-</b> Mapa del rRNA nuclear. En dirección 5'-3' se muestra en orden: la unidad pequeña rRNA nuclear, seguido del intrón ITS1, el exón 5.8S rDNA, la región ITS2 y la subunidad larga del rRNA nuclear. Tomado de Holst-Jense, 1997. ....	43
<b>Figura 4.-</b> Morfología de conidios de <i>Monilinia spp.</i> observados al microscopio (40X) del aislamiento I01. ....	44
<b>Figura 5.-</b> Aislamiento I07, donde se observa la ausencia de micelio del hongo y la abundancia de sus esporas en medio V8-MA, después de dos semanas de subcultivo. ....	44
<b>Figure 6.-</b> Aislamiento T04, en donde se observa el crecimiento de micelio y la presencia de esporas en el borde del mismo a medida que el hongo se expande en medio V8-MA. ....	45
<b>Figura 7.-</b> Patrón de crecimiento de micelio del aislamiento I03 en medio PDA (a) donde el margen del micelio es lobulado y en medio V8-MA (b) donde el crecimiento del micelio es concéntrico. ....	45
<b>Figura 8.-</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5% donde se observa la concentración y calidad de ADN genómico extraído usando tres variables en el protocolo de extracción de ADN para hongos a partir del crecimiento de micelio de la muestra T04 en medio PDB. T04: maceración de micelio con CTAB; T04S: maceración de micelio con Sand White Quartz y Buffer CTAB; T04N: maceración de micelio con Nitrógeno líquido y CTAB. ....	46
<b>Figura 9.-</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5% donde se observa la amplificación de la región ITS para la especie de <i>Monilinia fructicola</i> en 11 de las 21 muestra analizadas. El ladder 100pb (Axygen) se presenta en el primer carril, seguido de las 21 muestra analizadas y el último pocillo corresponde al control negativo.....	46
<b>Figura 10.-</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Ladder de 100pb (Axygen). Ausencia de amplificación de la región ITS en la reacción de PCR utilizando primers específicos para <i>Monilinia fructigena</i> . ....	47
<b>Figura 11.-</b> Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Ladder de 100pb (Axygen). Ausencia de amplificación utilizando primers específicos para las regiones ITS de la especie <i>Monilinia laxa</i> . ....	47
<b>Figura 12.-</b> En el primer carril se observa el ladder 100pb (Axygen) y en los siguientes 21 carriles se encuentran las muestras analizadas en el estudio. El último carril corresponde al control negativo. De las 21 muestras analizadas 11 fueron identificadas como <i>Monilinia fructicola</i> mediante la reacción de PCR múltiple, usando primers tipo SCAR en un gel de Agarosa 1,5%. ....	47

# 1. Introducción

## 1.1. *Prunus persica*

### 1.1.1. Origen y descripción de *Prunus persica*

El durazno o melocotón es un árbol deciduo que pertenece a la familia *Rosaceae*. Es originario del Oeste de China y según la evidencia arqueológica y literaria se presume que fue domesticado alrededor del 3.000 A.C. (Desmond y Bassi, 2008). El árbol de durazno puede alcanzar 8 metros de altura, sus hojas son lanceoladas y las flores presentan una gama de colores entre blanco y rosado, según la variedad. Sus frutos se caracterizan por tener un endocarpio endurecido y un mesocarpio carnoso. En el caso de *Prunus persica* var. Diamante, la piel es pubescente, mientras que en *Prunus persica* var. Nectarina la piel es lisa y de coloración rojiza (Desmond y Bassi, 2008).

Dependiendo de las condiciones climáticas en las que se encuentren las plantaciones de durazno, este frutal puede llegar a tener una vida media de 12 a 17 años, alcanzando su edad productiva a partir del sexto o séptimo año (Whealy, *et.al*, 2001). *Prunus persica* requiere de la acumulación de horas o unidades frío para inducir la secreción de hormonas vegetales, las cuales estimulan la floración en el árbol. Según cada variedad, las condiciones de crecimiento son diferentes, muchas de éstas requieren alrededor de 600 a 900 horas frío para tener un crecimiento óptimo en zonas de cuatro estaciones. Pero en el caso de variedades que se han adaptado a climas más templados, es suficiente una exposición de 200 horas frío que le permiten inducir la floración (Whealy, *et.al*, 2001).

El fruto aparece después de un periodo de 90 a 180 días posterior a la acumulación de las horas frío necesarias. En los cultivos a gran escala este requerimiento puede inducirse artificialmente, utilizando diferentes productos químicos que tienen la función de enfriar la raíz e inducir de este modo la secreción de hormonas vegetales en la planta. Además de los productos agroquímicos utilizados que aceleran la floración, también existen otras técnicas que permiten que el árbol de durazno mejore su rendimiento y pueda producir mayor cantidad de cosechas a lo largo del año. El manejo de podas permite renovar las ramas del árbol y otras técnicas como el aclareo permiten incrementar el tamaño del fruto (Whealy, *et.al*, 2001).

#### 1.1.2. Importancia económica de *Prunus persica* a nivel mundial

El durazno es vendido en el mercado de forma fresca, en productos como helados y yogurt o como fruta procesada: conservas, pulpas, mermeladas, jugos, jaleas o como fruta deshidratada (USDA, 2010). En el año 2010 la producción mundial de durazno alcanzó 1.3 millones de toneladas métricas (MAGAP, 2010).

El principal productor de durazno y nectarinas a nivel mundial es China. Este país concentra aproximadamente el 63% de producción y demanda el 66% de la oferta (FAS-USDA, 2010). En América del Sur los principales productores de la fruta son Chile y Argentina (FAOSTAT, 2011). Chile exporta casi el 90% de duraznos enlatados a países de Latinoamérica, especialmente al mercado mexicano (USDA, 2010).

#### 1.1.3. Producción de *Prunus persica* en el Ecuador

En el año 1924, Popenoe reportó al durazno como uno de los cultivos extensivos en las provincias de Tungurahua y Azuay. Ambato era considerado como centro de la

comercialización y producción de la fruta debido a que las condiciones del clima favorecieron la adaptación de este frutal traído desde el extranjero (Popenoe, 1924). Este reporte también indica que existía una gran diversidad de duraznos dentro de la zona que incluían variedades como Diamante, Nectarinas y Abridores. Pero en la actualidad, la variedad Diamante predomina en los cultivos de durazno, que se han extendido a regiones del norte de país, ya que es una variedad mejorada desarrollada por el INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias) (SIGAGRO, 2010).

En el 2009 la superficie cosechada de durazno en el Ecuador se redujo con respecto a la de años anteriores (SIGAGRO, 2010). Debido a esto, el país se vio obligado a importar esta fruta de otros países como Chile, Estados Unidos y Perú (Estadísticas: Comercio Exterior, 2011). Desde enero hasta el mes de agosto del 2010, el país adquirió 3,601.05 toneladas de duraznos (incluidas nectarinas), siendo Chile el principal proveedor de fruta con el 50% del total comprado (Estadísticas: Comercio Exterior, 2011). Lo cual indica que aún se necesitan implementar métodos que incrementen el rendimiento de este frutal en el país.

#### 1.1.4. Enfermedades de durazno en el Ecuador

Una de las causas que afecta el rendimiento de este cultivo son los patógenos. Específicamente, en lo que respecta a las enfermedades fúngicas, los cultivos nacionales de durazno se encuentran afectados básicamente por dos tipos de hongos: *Taphrina deformans* conocida también como cloaca, la cual enrolla y daña las hojas y *Monilinia spp.*, causante de la podredumbre morena, conocida así por atizonar y podrir los frutos.

En el país, las variedades de *Prunus persica* como Conserveros y Abridores, son susceptibles a contraer otras enfermedades fúngicas como *Oidium*, *Tranzchelia prunispinoseae*, conocida comúnmente como roya y *Clasterosporium carpofilum*, también llamada tiro de munición, la cual causa despigmentación de hojas y fruto (Ing. Pablo Viteri, INIAP, comunicación personal).

En lo que respecta específicamente a *Monilinia spp.*, las pérdidas en los cultivos de durazno pueden alcanzar un 50% mientras la fruta aún se encuentra en el huerto, pero esta cifra tiende a incrementarse a medida el durazno es almacenado, transportado y comercializado (Ing. Pablo Viteri, INIAP, comunicación personal).

## 1.2. Infección de Podredumbre Morena causada por *Monilinia spp.*

### 1.2.1. Taxonomía de *Monilinia spp.*

*Monilinia spp.* está clasificada dentro de los hongos superiores. Pertenece a la subdivisión de los Ascomycetos. Sus ascas o sacos contienen grupos de ocho esporas sexuales denominadas ascosporas (Figura 1). La fase asexual del hongo se denomina Monilia y se produce cuando cada hifa termina en conidios, los cuales son las esporas asexuales externas (Agrios, 1995). Las ascas que se forman en la superficie tienen apariencia de copa por lo que están dentro de la clase de los Discomycetes, pertenece al orden Helotiales y a la familia Sclerotiniaceae. A nivel mundial se han reportado tres especies de *Monilinia* causantes de la podredumbre morena: *M. laxa*, *M. fructigena* y *M. fructicola* (Fulton, 1999).

### 1.2.2. Ciclo de infección y epidemiología de *Monilinia spp.*

La Podredumbre morena o parda, causada por *Monilinia spp.*, es una de las enfermedades más importantes que afecta a los frutales de hueso, como drupas y pomos, los cuales incluyen a duraznos, cerezos, ciruelas y almendros, los mismos que poseen un mesocarpio carnoso y un endocarpio endurecido (Gell, *et.al*, 2007). Esta enfermedad es más severa en frutales de la familia *Rosaceae* a la cual pertenece *Prunus persica* (Holst, *et.al.*,1997). Epidemiológicamente *M. laxa* afecta preferentemente a ramas y flores, *M. fructigena* causa daño principalmente en frutos y *M. fructicola* afecta con la misma incidencia a ramas, flores y frutos (Fulton, et al. 1999).

*Monilinia spp.* depende específicamente de una elevada humedad en el ambiente para que las esporas puedan germinar. La temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad es de 20-25°C (Agrios, 1995). El ciclo de infección en las tres especies de *Monilinia* es el mismo. Las primeras lesiones típicas de la infección se presentan como manchas cafés en la superficie de inflorescencias y/o frutos, los cuales se tornan de color grisáceo, ya que los conidios (fase asexual) del hongo recubren su superficie (Fulton, *et. al*, 1999). La podredumbre morena, conocida así por atizonar la fruta, puede llegar a causar una condición, que en el durazno se ha denominado “momia” o fruto momificado (Agrios, 1995) (Figura 2), el mismo que constituye el principal reservorio de esporas del hongo y puede adherirse a las ramas, atizonándolas. Las esporas son dispersadas por agentes como el viento, la lluvia e insectos (Gell, *et al.* 2007).

El árbol de durazno, independientemente de la variedad, es más susceptible a contraer la enfermedad de podredumbre morena en el periodo de floración y madurez del

fruto. Es por esto que la infección causada por *Monilinia* puede presentarse cuando la fruta se encuentra aún en el huerto, así como en la etapa post-cosecha (transporte, almacenamiento y venta en el mercado), llegando a alcanzar pérdidas mayores al 75% en los cultivos de duraznos a nivel mundial (Agrios, 1995).

### 1.2.3. Distribución de *Monilinia spp.* a nivel mundial

Las tres especies de *Monilinia* conocidas mundialmente tienen diferente distribución. Se conoce que en Europa, *M. laxa* y *M. fructigena* han coexistido durante largo tiempo, siendo las principales especies causantes de pérdidas económicas en cultivos de peras y manzanas, y en poca medida en duraznos de todo el continente (Fulton, *et al.*, 1999).

En Asia, específicamente en Japón, *M. fructigena* ha sido ampliamente identificada en cultivares del género *Prunus spp.* (duraznos y almendros). Los reportes más recientes muestran que en este país se ha identificado a una nueva especie, conocida como *Monilinia polystroma*, la cual causa la misma sintomatología descrita para las especies anteriores (Cotè, 2004). *M. polystroma* posee características morfológicas similares a *M. fructigena*, pero difiere de ésta ya que sus conidios son mucho más pequeños y su velocidad de crecimiento es mayor. Las diferencias morfológicas que han determinado que *M. polystroma* sea considerada como una nueva especie han sido avaladas por técnicas moleculares (Petróczy y Palkovics, 2009).

*M. fructicola*, en cambio, es conocida como una especie del nuevo mundo, cuya distribución se limitaba solamente al continente americano antes de 1997, pero en la actualidad se conoce que esta especie se ha expandido a Japón, Australia y España,



incrementando la pérdida en cultivos de nectarinas y duraznos (EPPO, 2009). En norte América, Estados Unidos reportó la presencia de *M. fructicola* y *M. laxa* en cultivos de cerezos (Snyder y Jones, 1999). En lo que respecta a América del sur, se presentan dos reportes sobre la podredumbre morena en cultivos de durazno, en Uruguay se ha encontrado como único agente causal a *M. fructicola*, mientras que en Argentina *M. laxa* y *M. fructicola* son los responsables de esta enfermedad (Malvárez, 2004; Mitidieri, *et al.* 2005).

### 1.3. Control de *Monilinia spp.*

#### 1.3.1. Control químico

En el mercado se encuentran disponibles dos tipos de fungicidas: sistémicos y de contacto. Los primeros penetran los tejidos de la planta y le brindan a ésta, protección total contra el hongo (Thomson, 1994). Por otro lado, los fungicidas de contacto, protegen a la planta, en la superficie donde han sido roseados (Gregori, 2005).

La podredumbre morena ha sido controlada con varios tipos de fungicidas, entre éstos los más importantes han sido los benzimidazoles (benomyl), dicarboximidas, inhibidores de la biosíntesis del ergosterol y fenilamidas, además de compuestos como cobre, azufre y captan (Thomson, 1994). Actualmente, se conoce que el uso persistente de dicarboximidas en frutales de durazno, específicamente en Corea, ha hecho que *M. fructicola* desarrolle resistencia a este compuesto (Lim y Cha, 2003).

### 1.3.2. Control biológico

Debido a las repercusiones ambientales que tienen los agentes de control químico se han buscado métodos biológicos para minimizar el crecimiento y esporulación de *Monilinia spp.* (Thomson, 1994). Algunos estudios en laboratorio, realizando cultivos duales, sugieren que se podría usar hongos antagónicos para contrarrestar la podredumbre morena. *Trichoderma* es uno de los candidatos para ser usado en ensayos de biocontrol (Cundom, *et al.* 2000). También se ha sugerido el uso de bacterias mesófilas, como *Bacillus amyloliquefaciens*, ya que en estudios de campo realizados en cultivos de duraznos, se logró obtener una reducción del 90% de la enfermedad en la etapa post-cosecha (Zhou, 2008).

### 1.4. Marcadores Genéticos

El nombre de marcador es aplicado a un segmento de ADN que tiene una ubicación física inidentificable en un cromosoma y que puede ser rastreado como un patrón hereditario. El marcador puede ser un gen o una sección de ADN que no tiene función conocida (Cubero, 2002). Existen tres tipos de marcadores genéticos: morfológicos, bioquímicos y moleculares. Los primeros se basan en diferencias fenotípicas encontradas en un individuo, pero su desventaja radica en que las características pueden estar influenciadas por el ambiente y por tanto no son confiables (Vienne, 2002). En el caso de los marcadores bioquímicos, también conocidos como marcadores enzimáticos, la información que se obtiene está basada en el estudio de isoenzimas y aloenzimas para determinar la variabilidad genética presente en una población (Cubero, 2002). Su desventaja radica en que el número de loci detectables es muy limitado (Vienne, 2002).

Finalmente, los marcadores genéticos moleculares son porciones de ADN que pueden asociarse con una característica en el organismo de interés. Algunos de estos marcadores pueden ser arbitrarios: RAPD (Random amplified DNA) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), mientras que otros marcadores generan información sobre regiones específicas en el genoma y se han diseñado a partir de secuencias conocidas de ADN: SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions ), RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphisms), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), SSR (Simple Sequence Repeat) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Vienne, 2002).

#### 1.4.1. Formas de identificación de especies de *Monilinia spp.*

El método tradicional de identificación de especies de *Monilinia*, se basó en el uso de marcadores morfológicos, entre los cuales se tomaba en cuenta la velocidad, el patrón de crecimiento y la coloración del micelio, al igual que las dimensiones de conidios (Ioos y Frey, 2000). Muchas de las características usadas en la identificación se solapaban entre especies y ciertos aislamientos presentaban morfologías atípicas, por lo cual la identificación de especies usando marcadores morfológicos era ineficiente (EPPO, 2009).

Willems en 1977 utilizó marcadores bioquímicos para diagnosticar y clasificar a *Monilinia spp.* basándose en la diferencia del punto isoeléctrico de 4 enzimas, implicadas en la degradación de paredes celulares del hospedador. Los diferentes patrones de intensidad en el punto isoeléctrico de las enzimas de cada especie de *Monilinia*, permitieron su identificación en las muestras analizadas. Sin embargo, este método de diagnóstico tampoco puede ser utilizado de forma rutinaria ya que no ofrece la rapidez necesaria para identificar el patógeno en envíos perecederos de frutas (EPPO, 2009).

Dentro de los marcadores moleculares más utilizados para identificar las especies de *Monilinia*, están la amplificación de regiones ITS (Internal Transcribed Spacer), RFLP, variaciones en el segmento 18S de la subunidad pequeña de ADN ribosomal (SSU rDNA: Small Subunit Ribosomal DNA), SCAR y microsatélites (Cotè, *et al.*, 2004). De todos estos métodos que se han probado, los más eficientes para la identificación de las especies de *Monilinia* han sido la amplificación de regiones ITS y los marcadores SCARs, ya que el resto de marcadores solo identificaban dos de las tres especies de *Monilinia* descritas globalmente (Gell, *et al.*, 2007).

#### 1.4.2. Regiones ITS

Para el estudio filogenético y taxonómico de hongos, las regiones ITS nucleares son las más comunes para trabajar. En el transcrito de ARN ribosomal existen regiones codificantes llamadas exones y regiones no codificantes que deben ser eliminadas para su maduración, llamadas intrones. Los componentes codificantes del ARNr primario son: 28 S, 18 S y 5,8S. El gen 18S del ADNr ha variado a lo largo de la evolución y puede ser utilizado para evaluar las relaciones entre las órdenes de hongos, además de discriminar entre dominios dentro de los reinos. Entre los genes 28S y 18S se encuentra otro gen que es el 5.8 S, que a su vez se encuentra flanqueado antes del splicing por dos secuencias ITS determinadas como ITS1 e ITS2 (Figura 3). Estos espacios internos de transcripción son menos conservados que las regiones codificantes, generalmente varían lo suficiente para ser utilizados como herramienta para la discriminación de especies dentro de un género (Carlile, 2001).

### 1.4.3. Marcadores SCAR

Las técnicas usando primers arbitrarios de 10 pares de bases, como los RAPDs, permiten obtener una huella digital del organismo de interés. Estos marcadores son dominantes y amplifican secuencias pequeñas (entre 14 y 20 pb) abarcando todo el genoma del organismo. Su desventaja radica en que los RAPDs son marcadores dominantes y no son altamente reproducibles. Los fragmentos de ADN genómico amplificados por PCR utilizando RAPDs pueden ser clonados y secuenciados para diseñar primers específicos que generen amplicones codominantes y a éstos se los denomina SCAR (Vienne, 2002).

El presente estudio tuvo como objetivo principal identificar las especies de *Monilinia* presentes en los cultivos de durazno de 4 provincias de la sierra ecuatoriana. Para esto se aislaron y analizaron 21 muestras de hongo provenientes de duraznos infectados con podredumbre morena y frutas momificadas. En el análisis molecular se usaron primers que amplifican la región ITS en reacciones de PCR individuales y se confirmaron los resultados usando una reacción de PCR múltiple con primers tipo SCAR.

## 2. Objetivo General

Determinar mediante métodos moleculares las especies de *Monilinia spp.* que afectan los cultivos de *Prunus persica* en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua.

### 3. Objetivos Específicos

- Aislar *Monilinia spp* a partir de frutos de durazno infectados, colectados en 4 provincias de la sierra ecuatoriana.
- Establecer un protocolo eficiente de extracción de ADN del hongo
- Determinar las especies de *Monilinia* usando tres pares de primers que amplifican las regiones ITS del DNAr en reacciones de PCR separadas y 4 primers tipo SCAR en una reacción de PCR múltiple.

### 4. Área de Estudio

El material analizado en este estudio fue colectado en diferentes zonas de cultivo de durazno en cuatro provincias de la sierra ecuatoriana: Carchi, Pichincha, Imbabura y Tungurahua. Tanto el aislamiento como el análisis molecular de las muestras se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales); Cumbayá - Ecuador.

### 5. Justificación

Históricamente, la provincia de Tungurahua era la zona tradicional de cultivo de duraznos en el Ecuador, la cual abastecía estacionalmente al mercado nacional, en los meses de febrero y marzo (Popenoe, 1924). Actualmente, este cultivo se ha expandido a provincias del norte del país como: Pichincha, Imbabura y Carchi; en donde, mediante el uso de productos agroquímicos y manejo de podas se ha logrado intensificar la producción

de este frutal, permitiéndose la cosecha de duraznos a lo largo de todo el año (SIGAGRO, 2010).

A pesar del aumento en la producción de duraznos y nectarinas en el país, el rendimiento aún es insuficiente para abastecer la demanda del mercado nacional, por lo cual la fruta es importada desde otros países como Chile, Estados Unidos y Perú (Estadísticas: Comercio Exterior, 2010).

Para que el mercado nacional pueda mejorar su competitividad, es necesario implementar metodologías que aumenten tanto la producción como el rendimiento de este frutal. Un mecanismo para lograrlo es el control de los patógenos que afectan a este cultivo. La podredumbre morena causada por *Monilinia spp.* es de especial importancia ya que la enfermedad puede presentarse tanto dentro del huerto, así como en la etapa post-cosecha, causando pérdidas mayores al 50%. La identificación de la especie de *Monilinia* que afecta a los cultivos de durazno nacionales puede servir para implementar métodos de control que sean dirigidos de forma específica al patógeno y además podría ser útil para prevenir su expansión a otros frutales susceptibles a contraer esta enfermedad, como cultivos del género *Pyrus spp.* y *Malus spp.*, dentro de los cuales están las peras y las manzanas, respectivamente (Gell, *et al.*, 2007).

## 6. Materiales

### 6.1. Colección de duraznos infectados

El material biológico utilizado en este estudio fue colectado en 34 localidades del Ecuador: 4 en Carchi, 7 en Pichincha, 9 en Imbabura y 14 en Tungurahua. En cada plantación se colectaron entre 1-8 frutos de duraznos que presentaban sintomatología típica de la enfermedad y también frutos momificados, además se compraron frutos de durazno con las mismas características en 5 mercados: 3 en Tungurahua y 2 en Imbabura. Todas las muestras fueron colocadas individualmente en un recipiente de plástico con tapa. La nomenclatura usada en esta etapa del estudio corresponde a la primera inicial de la provincia, seguida de un número ordinal según el orden de colección y adicionalmente, la variedad de durazno (Tabla 1).

### 6.2. Aislamiento de *Monilinia spp.* a partir de frutos infectados

- Medio de cultivo V8- MA (Anexo 1)
- Gentamicina MK (40mg/L)
- Durazno infectado con *Monilinia spp.*
- Agua destilada autoclavada
- Hipoclorito de sodio 2,5%
- Cámara de flujo laminar Labconco 37500-05
- Incubadora Vindon Scientific 22907

### 6.3. Caracterización morfológica de los hongos aislados de frutos de durazno infectados

- Porta y cubre objetos



- Azul de metileno
- Microscopio (Reichert- Komp 12,5X)

#### 6.4. Cultivos monospóricos de *Monilinia spp.*

- Medio V8-MA
- Agua destilada autoclavada
- Aislamientos del hongo con abundante esporulación identificados morfológicamente como *Monilinia spp.*
- Cámara de flujo laminar (Thermo scientific HERAGuard HPH 15)

#### 6.5. Cultivo de micelio y extracción de ADN de hongo

- Medio de cultivo líquido papa dextrosa (PDB) DIFCO (Anexo 2)
- Agar de papa dextrosa (PDA) DIFCO (Anexo 3)
- Gentamicina MK (40mg/ml)
- Tamiz
- CTAB 2X
- Sand White Quartz (Sigma Aldrich, -50 +70 mesh)
- B-mercaptoetanol (10 $\mu$  por cada 1000  $\mu$ l de CTAB)
- Cloroformo/alcohol isoamílico 25:1
- Isopropanol
- Etanol 76%
- Buffer TE (Tris 10mM, 1mM EDTA, pH 7,5)
- Cama de arena Thermo scientific 2052

- Centrífuga Eppendorf 5415D
- Balanza analítica Sartorius LA 230 S
- Agitador Barnstead LabLine Max-Q 4000

#### 6.6. Cuantificación de ADN extraído a partir de micelio del hongo

- NanoDrop Thermo scientific 1.0000
- Buffer TE (Tris 10mM, 1mM EDTA, pH 7,5)

#### 6.7. Amplificación de regiones ITS

- ADN de micelio de hongo (10ng/μl)
- Buffer de reacción 1X (Invitrogen)
- 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
- 200 μM de dNTPs (Invitrogen)
- 0,2 μM de cada par de primers (Tabla 4)
- DNA Taq polimerasa (Invitrogen)
- Termociclador T personal 6138

#### 6.8. PCR múltiple usando primers tipo SCAR

- Tubos eppendorf de 0,2 mL
- ADN de micelio (10ng/μl)
- Buffer de reacción 1X (Invitrogen)
- 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
- 0,2 mM dNTPs (Invitrogen)

- 0,1 mM de cada primer (Tabla 5)
- DNA Taq polimerasa (Invitrogen)
- BSA (1mg/mL)
- Termociclador T personal 6138

#### 6.9. Electroforesis en gel de Agarosa

- Agarosa 1,5% (SeaKem)
- TBE 1X
- SYBR safe (10.000X, Invitrogen)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder de 100 bp (Axygen)
- Cámara de electroforesis horizontal Scientific Co. MGU-502T
- Fuente de poder Scientific Co. EPS-300 II C.B.S
- Fotodocumentador (Molecular Imager: BIO-RAD; Gel Doc XR)

## 7. Métodos

### 7.1. Desinfección de frutos infectados y aislamiento de *Monilinia*

Los duraznos colectados fueron lavados con agua potable abundante para retirar el exceso de polvo y otras impurezas, posteriormente se los secó con papel absorbente y con ayuda de un bisturí se cortaron trozos rectangulares del pericarpio de aproximadamente 1cm de largo x 0,8 cm de ancho, tratando de que la mitad del pedazo de durazno tuviera tejido enfermo y la otra mitad fuera sana. Dependiendo del grado de afección del durazno

se pudo obtener aproximadamente de 4 a 8 pedazos de cada fruta, los mismos que se colocaron en un vaso de precipitación para lavarlos con agua destilada estéril durante 30 segundos dentro de la cámara de flujo laminar. Posteriormente, con ayuda de una pinza, éstos fueron colocados en otro vaso de precipitación para desinfectarlos con hipoclorito de sodio al 2,5%, durante 30 segundos con agitación constante. Finalmente, los pedazos de durazno fueron lavados en agua destilada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito de sodio y luego secados en papel absorbente autoclavado, para su posterior siembra en cajas petri con medio V8-MA, las cuales fueron incubadas durante 4 días a 25°C en oscuridad.

Pasado este periodo, las cajas que presentaron desarrollo de micelio alrededor de los pedazos de durazno sembrados, fueron subcultivados en medio V8-MA bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, para su posterior identificación morfológica.

Los frutos de durazno que no presentaban atizonamiento en la superficie del pericarpio, pero que tenían una pequeña mancha café en éste, fueron llevados a cámara húmeda, en donde se dejó que la lesión avance, colocando al fruto en un recipiente de plástico estéril con tapa junto con una torunda de algodón estéril humedecido con agua destilada autoclavada. Estos recipientes fueron incubados durante 4 días a 25°C.

## 7.2. Aislamiento de *Monilinia* a partir de frutos momificados

Los frutos momificados fueron colocados individualmente dentro de un recipiente de plástico estéril con tapa, en donde se encontraba también una torunda de algodón

humedecido previamente con agua destilada autoclavada. Cada recipiente fue incubado a 25°C para inducir esporulación del hongo sobre la fruta momificada, entre 4 a 6 días.

Terminado el tiempo de incubación las esporas de hongo que crecieron en la superficie fueron recogidas con una pinza flameada previamente y se las colocó sobre una caja petri con medio V8-MA, la misma que se incubó 4 días a 25°C en oscuridad.

### 7.3. Identificación morfológica de *Monilinia spp.*

Para la identificación morfológica de *Monilinia spp.* se tomaron en cuenta las características tanto del micelio como de las esporas, siguiendo la clave taxonómica (Tabla 4 y Figura 4) (Streets, 1982 y EPPO, 2009).

Para observar la morfología de las esporas correspondientes a cada aislamiento se recogió con una pinza estéril las esporas que se encontraban sobre la superficie del micelio que creció en medio V8-MA y se las colocó sobre una gota de azul de metileno que se encontraba previamente en un portaobjetos. Inmediatamente, se cubrió con un cubreobjetos y se llevó al microscopio para ser observado.

Los aislamientos que poseían las características morfológicas tanto de esporas como de coloración de micelio, según las descritas en la clave taxonómica utilizada (Streets, 1982 y EPPO, 2009), fueron conservadas, realizando subcultivos cada tres semanas en medio V8-MA. Dentro de este periodo, los primeros 4 días después del subcultivo las cajas fueron incubadas a 25°C y luego se mantuvieron a temperatura ambiente hasta un nuevo subcultivo.

#### 7.4. Cultivos monospóricos de muestras identificadas morfológicamente como *Monilinia spp.*

Los 21 aislamientos de hongo identificados morfológicamente como *Monilinia spp.* fueron sometidos a continuos subcultivos en medio V8-MA (3-5 veces) para inducir mayor esporulación. Para cada aislamiento se escogió una caja petri que presentaba abundante esporulación y se realizó con ella, el cultivo monospórico.

Dentro de la cámara de flujo laminar se colocó una gradilla con seis (6) tubos eppendorf de 1.5 ml, debidamente rotulados, para realizar las diluciones respectivas, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . En cada tubo se colocaron 900  $\mu$ l de agua destilada estéril. Paralelamente a esto, se agregaron 5000  $\mu$ l de agua destilada estéril en la caja petri que contenía el cultivo del hongo con esporulación abundante. La caja se movió lentamente con el fin de suspender las esporas en el volumen de agua añadido. Después, se tomó con una micropipeta 100  $\mu$ l de esta solución con esporas y se colocó en el primer eppendorf. Luego de agitar vigorosamente para homogenizar la distribución de esporas en el volumen de agua del primer tubo,  $10^{-1}$ , se tomó de éste 100  $\mu$ l de solución y se la pasó al eppendorf de  $10^{-2}$  y así sucesivamente hasta llegar a la dilución  $10^{-6}$ .

Finalmente, se sembró 50  $\mu$ l de cada dilución de esporas en una caja petri diferente con medio V8-MA, distribuyéndola uniformemente con un asa de vidrio previamente flameada. Posteriormente, las cajas sembradas en medio V8-MA se incubaron a 25°C por una semana. Pasado este tiempo, se escogieron las cajas en las cuales las colonias provenientes de esporas individuales habían crecido independientemente, las mismas que fueron sembradas en nuevas cajas petri con medio V8-MA.

### 7.5. Extracción de ADN del hongo a partir de micelio

Debido a que el micelio del hongo que crecía en las cajas petri con medio V8-MA era insuficiente para realizar la extracción de ADN, fue necesario probar otros medios que permitieran incrementar la cantidad de éste. Los medios probados fueron PDA y PDB. En el primer caso se cortó un pedazo de agar que contenía micelio joven del hongo aislado el cual se encontraba creciendo en medio V8-MA y se lo sembró en medio PDA, incubándolo a 25°C por 5 días. En el segundo caso, se colocó el pedazo de agar con micelio en un erlenmeyer con medio líquido PDB, el cual se mantuvo durante 24 horas en agitación constante (100 rpm) a 27°C, cubriéndolo con papel aluminio.

El crecimiento de micelio fue más rápido y abundante en el segundo ensayo por lo cual fue escogido para realizar la extracción de ADN a partir del micelio que había crecido en cada erlenmeyer con medio PDB, el mismo que fue recuperado cirniéndolo en un tamiz.

Se realizaron tres ensayos para extraer ADN de micelio del hongo, con variables en la forma de maceración. En los tres casos se pesó en una balanza 0,3 g de micelio que creció en medio PDB. El primer ensayo consistió en triturar el micelio únicamente con buffer CTAB, en el segundo se utilizó nitrógeno líquido más buffer CTAB y en el tercero, se maceró el micelio con buffer CTAB y Sand White Quartz (Sigma Aldrich, -50 +70 mesh). El tercer ensayo fue escogido debido a que se obtuvieron mejores resultados cuando se comparó con los otros dos protocolos de extracción de ADN probados. A continuación se detalla el protocolo seleccionado.

Se colocó 0,3 g de micelio que creció en el medio PDB, en un mortero desinfectado y se añadió 0,9 g de Sand White Quartz (Sigma Aldrich, -50 +70 mesh) (proporción 3:1). Después, se añadió 800 µl de buffer CTAB y se maceró la mezcla hasta homogenizarla. El micelio macerado fue transferido a un nuevo tubo eppendorf rotulado en el cual se agregaron 8µl de β- mercaptoetanol. Posteriormente, la muestra fue incubada en una cama de arena a 62°C, durante una hora, con agitación cada 10 minutos. Pasado este tiempo, al tubo eppendorf se le adicionó 500 µl de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1), se lo agitó y se procedió a centrifugarlo 20 minutos a 13.200 rpm. El sobrenadante fue recuperado y colocado en un nuevo tubo eppendorf rotulado en donde se agregó 500 µl de isopropanol (4°C). Posteriormente, se centrifugó a 5.000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet obtenido con 500 µl de etanol 70%, el cual se desechó, para proseguir con el secado del ADN aislado en la cámara de flujo laminar. Finalmente, se resuspendió el pellet de ADN obtenido en 75 µl de TE y se conservó la muestra a -20°C hasta su uso.

La cuantificación de ADN fue realizada en el NanoDrop1000 Thermo scientific y se lo sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% para corroborar su calidad.

#### 7.6. Protocolo de amplificación de regiones ITS

Se realizaron tres reacciones individuales de PCR con tres pares de primers, cada par específico para las regiones ITS de cada una de las tres especies de *Monilinia* que se deseaba identificar (Tabla 4).



La reacción de amplificación fue realizada en un volumen de 10 µl, que contenía 1X de Buffer de Taq Polimerasa (Invitrogen); 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTPs, 0,2 µM de cada primer y 40 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial (94°C, 3 min) seguido de 30 ciclos de denaturación (94°C, 3 s), annealing (57°C, 3 s) y extensión (72°C, 1,5 min), con una extensión final (72°C, 10 min) (Ioos y Frey, 2000). El termociclador utilizado para la amplificación fue de Biometra, T personal.

#### 7.7. Protocolo de amplificación de ADN mediante PCR múltiple, usando primers tipo SCAR

Para la reacción de PCR se utilizaron tres primers forward específicos para cada una de las especies de *Monilinia*: MO368- 12 (*M. laxa*), MO368-8R (*M. fructigena*) y MO368- 10R (*M. fructicola*) y un primer reverse común para las tres, MO368-5 (Cotè, *et al.* 2004). El tamaño de banda esperado para cada especie se detalla en la Tabla 5, al igual que la secuencia de cada primer.

La reacción tuvo un volumen final de 10 µl y consistió de: Buffer de reacción de PCR 1X; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> 0,5 mg/ml de BSA; 0,2 mM de dNTPs; 0,1 mM de cada primer; 0,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), y 40ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C por 30s, 60 °C por 60s, 72 °C por 30s durante 5 ciclos; 95 °C por 30s, 63 °C por 60s, 72 °C por 30s durante 35 ciclos con una extensión final de 5 minutos a 72 °C (Cotè, *et al.* 2004). El termociclador utilizado para la amplificación fue Biometra, T personal.

## 7.8. Electroforesis en gel de Agarosa

Para visualizar los productos de amplificación en cada reacción de PCR, se realizó un gel de agarosa al 1,5%. Se colocó en un erlenmeyer 100ml de TBE 1X más 1,5g de agarosa y se lo calentó en el microondas para su disolución, una vez homogenizada la solución se dejó enfriar hasta que la temperatura de la superficie del frasco fuera tolerable al tacto. Inmediatamente después, se agregó 4  $\mu$ l de SYBR safe a la mezcla y se la vertió en un molde de solidificación. Para formar los pocillos del gel de agarosa se colocó el peine plástico en la parte superior del molde y se dejó solidificar por 20 minutos.

Los productos de PCR fueron preparados para ser cargados en el gel, añadiendo 2  $\mu$ l de Blue Juice 10X (Invitrogen) a los 10  $\mu$ l de la reacción de PCR. La electroforesis se realizó a 80 V por 90 minutos. El ladder utilizado fue de 100 pb (Axygen).

## 8. Resultados

### 8.1. Colección de frutos de durazno infectados y aislamiento de *Monilinia spp.*

Se colectaron tanto duraznos infectados como frutas momificadas, en 34 localidades: 4 en Carchi, 9 en Imbabura, 7 en Pichincha y 14 en Tungurahua. De estas muestras se escogieron 21 aislamientos (Tabla 1) debido a que éstos tenían características que correspondían con la descripción presentada por las claves taxonómicas (Streets, 1982 y EPPO, 2009).

La eficiencia en el aislamiento de *Monilinia* usando frutos momificados fue del 53.8% (7/13), mientras que el aislamiento de *Monilinia* obtenido mediante desinfección de

pedazos del fruto que presentaban sintomatología de podredumbre morena fue de 32.35% (11/34).

## 8.2. Características morfológicas de los aislamientos de hongo

Los 21 aislamientos de hongo, caracterizados morfológicamente como *Monilinia*, presentaron mayor esporulación a medida que aumentaba el número de subcultivos. En 10 de los 21 aislamientos: C02, I04, I05, I07, P03, T01, T02, T03, T05 y T06; se observó la ausencia de micelio y abundancia de esporulación sobre el medio V8-MA (Figura 5), la coloración de las esporas fue verde oscuro la primera semana después del subcultivo, pero a medida que transcurría el tiempo de cultivo *in vitro*, las esporas se tornaban de color plomo. Los 11 aislamientos restantes (C01, C02, I01, I02, I03, I06, P01, P02, P04, P05 y T04) presentaron crecimiento de micelio y en su borde, se observó la presencia de esporas a medida que éste iba creciendo, la coloración del hongo fue ploma desde el inicio del subcultivo y no cambió durante el tiempo de cultivo *in vitro* (Figura 6).

Dentro del estudio, también se obtuvo un aislamiento de hongo en la provincia de Imbabura, I03, que a medida que fue subcultivado, el patrón de crecimiento desarrolló una morfología similar a la descrita en la clave taxonómica de la EPPO (2009) para la especie de *M. laxa*, el margen del micelio era lobulado en medio PDA; sin embargo en medio V8-MA, la morfología presentada no coincidió con los parámetros descritos para esta especie, sino para las características de *M. fructicola* (Figura 7).

### 8.3. Cultivos monospóricos de los aislamientos de hongo

De las 21 muestras de hongo escogidas, se realizaron 17 cultivos monospóricos, ya que no todos los aislamientos mostraron presencia suficiente de esporas para realizar las respectivas diluciones. Las 4 muestras de las cuales no se obtuvieron cultivos monospóricos fueron: I02, I06, P02 y P05.

### 8.4. Extracción y cuantificación ADN de *Monilinia spp.*

Para incrementar la cantidad de micelio del hongo se escogió el medio PDB, debido a que el micelio creció en 24 horas después de su siembra, mientras que en el medio PDA el micelio no era abundante pasado los 5 días de incubación. En cuanto al método de extracción de ADN de micelio, el ensayo que produjo mejores resultados, debido a la intensidad de bandas que se observaron en el gel de agarosa (Figura 8), fue la maceración del micelio usando buffer CTAB más Sand White Quartz, comparado con los ensayos donde se maceró el micelio solamente con buffer CTAB o con nitrógeno líquido más CTAB.

La cuantificación del ADN extraído a partir de micelio de las 21 muestras de hongo analizadas, se presenta en la Tabla 5. Las concentraciones de ADN oscilaron entre 60,79 ng/μl hasta 4.218,23 ng/μl. Como la mayoría de muestras presentaban concentraciones elevadas de ADN, se decidió realizar diluciones estándares de 10ng/μl con las cuales se trabajó para las reacciones de PCR. Todas las muestras presentaron una relación (A260/A280) mayor a 1.8.

### 8.5. Amplificación de regiones ITS

La reacción de PCR usando primers específicos para *M. fructicola* amplificó una banda de 350 pb en 11 de las 21 muestra analizadas (Figura 9). Mientras que para *M. fructigena* y *M. laxa* no hubo amplificación (Figura 10 y 11).

La temperatura de annealing utilizada en esta investigación fue de 57°C, mientras que en el estudio de Ioos y Frey (2000) la temperatura recomendada para la amplificación en cada set de primers fue de 62,5°C.

### 8.6. Amplificación con primers tipo SCAR

El PCR múltiple utilizando primers tipo SCAR produjo una amplificación en 11 de las 21 muestras analizadas, con un tamaño de banda mayor a 500 pb, según se muestra en la Figura 12. El producto de amplificación esperado para *M. fructigena* era de 402 pb, en el caso de *M. fructicola* se esperaba un tamaño de 535 pb y finalmente, para *M. laxa* el producto esperado de amplificación era de 351 pb.

La temperatura de annealing recomendada para realizar el PCR múltiple fue de 60°C (Coté, *et al.* 2004). Dentro de este trabajo la temperatura de annealing utilizada en esta reacción de PCR usando primers tipo SCAR fue de 63°C, ya que a temperaturas menores se visualizaron bandas inespecíficas.

El producto de amplificación corroboró que las 11 muestras que habían sido identificadas como *M. fructicola* en las reacciones previas de PCR usando primers de regiones ITS, fueron las mismas que en esta última amplificación. Las muestras que fueron positivas para *M. fructicola* en cada provincia se presentan en la Tabla 6.

## 9. Discusión

### 9.1. Colección de frutos infectados y aislamiento de *Monilinia spp.*

En condiciones de campo *Monilinia* se desarrolla a temperaturas entre 20 a 25°C en el día y noches frescas, con requerimientos altos de humedad (EPPO, 2009). En el caso de Tungurahua las condiciones ambientales en la época de muestreo (finales de febrero e inicios de marzo del año 2010) no fueron favorables para el desarrollo del hongo, debido a que la región soportó un periodo extenso de sequía y baja humedad. A esto hay que agregar que el Volcán Tungurahua tuvo varias erupciones de ceniza en los últimos meses de 2009 y los primeros de 2010, por lo que se puede asumir que estos factores limitaron el crecimiento del hongo en los cultivos de durazno de esta provincia y por lo tanto *Monilinia* no pudo ser aislada en el laboratorio.

En el caso de las provincias de Pichincha, Imbabura y Carchi, las condiciones climáticas en la época de colección de las muestras (febrero, marzo, abril y julio de 2010) fueron favorables para el crecimiento del hongo en el campo; ya que se presentaron precipitaciones regulares, las cuales permitieron que el hongo tuviera condiciones de humedad aptas para su crecimiento y por lo tanto, su aislamiento fue mayor en estas tres provincias comparado con el de la provincia de Tungurahua.

La eficiencia de aislamiento de *Monilinia* a partir de frutas infectadas fue menor (32,35%) comparado con el aislamiento del hongo proveniente de frutos momificados (53,8%). Una de las razones para que esto ocurriera es que dentro de los frutos de durazno colectados, algunos presentaron las primeras lesiones típicas de la infección causada por

*Monilinia*, es decir, que sobre el pericarpio se observaron manchas de color café. Sin embargo, la podredumbre morena no es la única enfermedad que causa este tipo de sintomatología, existe otro fitopatógeno que causa los mismos daños en duraznos, denominado *Glomerella cingulata*, el mismo que es confundido comúnmente con *Monilinia fructicola* en la primera etapa de infección (Hartman, 2007). Esto sugiere que tal vez, no todos los frutos colectados que presentaban este tipo de lesiones en el pericarpio estaban realmente infectados con *Monilinia*. Por otro lado, los frutos momificados constituyen el principal reservorio de conidios (fase asexual del hongo) (Gell, *et al.*, 2007). Esto podría explicar porqué el porcentaje de eficiencia al aislar *Monilinia* fue mayor usando momias que frutos infectados.

Los resultados en este estudio revelan que las muestras de las cuales se pudo aislar *Monilinia* fueron momias colectadas directamente de las ramas de los árboles de durazno o que se encontraban infectando a frutos sanos; mientras que los frutos momificados de los cuales no fue posible aislar el hongo de interés, fueron recogidos del suelo. Esto sugiere que las momias que se encontraban en el suelo pudieron haber estado contaminadas con otros hongos, propios del sustrato, lo cual impidió el aislamiento de *Monilinia* en el laboratorio. A pesar de los resultados mencionados, la literatura menciona que los frutos momificados, que se encuentran tanto en el suelo como en las ramas de los árboles, pueden permanecer en estado de latencia hasta por dos años, pudiendo infectar a la cosecha siguiente, ya que mantienen las esporas de *Monilinia* viables (Mitidieri, 2005).

## 9.2. Identificación morfológica de *Monilinia spp.*

Los 21 aislamientos escogidos para el análisis molecular en este estudio fueron seleccionados de acuerdo a las características morfológicas presentadas en la clave taxonómica utilizada, basada en la coloración del micelio y la forma de las esporas (Streets, 1982 y EPPO, 2009). Los marcadores morfológicos poseen varias limitaciones, una de ellas es que las características fenotípicas tomadas en cuenta para la identificación morfológica de un individuo, dependen de la interpretación del observador (Vienne, 2002).

En este estudio, del total de muestras identificadas morfológicamente como *Monilinia*, solo 11 correspondieron al género de interés, mientras que las 10 muestras restantes, las cuales presentaron ausencia de micelio y abundante esporulación, no fueron identificadas como *Monilinia* en los análisis moleculares posteriores. La explicación para esto posiblemente es que las características de los aislamientos, en cuanto a coloración y forma de esporas, pudieron haber sido tergiversadas por el observador al momento de analizar las características fenotípicas de cada muestra, incluyéndose en el estudio muestras de hongos con morfología de esporas similar a *Monilinia*, como el caso de *Oidium* (Streets, 1982), pero que en realidad no pertenecían al género de interés en esta investigación.

En cuanto al aislamiento I03, los patrones de crecimiento que se muestran en la Figura 7a coinciden con la morfología descrita en la Tabla 4 para *M. laxa*, ya que el crecimiento de la muestra se dio en medio PDA. Este aislamiento posee bordes lobulados y la coloración de micelio es gris. Sin embargo, la misma muestra (I03) que se presenta en la Figura 7b, muestra un crecimiento diferente en medio V8-MA. La identificación molecular



muestra que este aislamiento corresponde a *M. fructicola*, pero la morfología de micelio al ser subcultivado en medio PDA presenta la apariencia de *M. laxa*.

La morfología atípica presentada por este aislamiento dentro del estudio concuerda con la publicación realizada por Malvárez, *et al.*, 2004, en donde también se reporta que un aislamiento tuvo características típicas de *M. laxa*, a pesar de que en el análisis molecular la muestra fue identificada como *M. fructicola*.

La identificación de especies de *Monilinia* usando marcadores morfológicos no solo difiere porque los aislamientos pueden tener fenotipos atípicos, sino que también varían de acuerdo al tiempo en el que la muestra ha sido mantenida *in vitro*. Se ha observado que a medida que el aislamiento tiene mayor número de subcultivos, el patrón de crecimiento del micelio tiene a ser ambiguo y la esporulación aumenta (EPP0, 2009). En este estudio se observó que las características fenotípicas de los aislamientos también pueden variar de acuerdo al medio en el cual estén creciendo. Además, se corroboró que mientras mayor es el número de subcultivos, los aislamientos tienden a producir mayor cantidad de esporas.

### 9.3. Identificación molecular de especies de *Monilinia spp.*

La temperatura de annealing recomendada por Ioos y Frey (2000) para la amplificación de regiones ITS, con sets de primers específicos para cada especie de *Monilinia*, fue de 62.5°C, ya que se obtuvo amplificación inespecífica a temperaturas entre 55 y 60°C (Ioos y Frey, 2000). Pese a esto, en el presente estudio, la temperatura utilizada

con cada set de primers fue de 57°C, ya que en temperaturas mayores no se observaba amplificación en ninguna de las reacciones de PCR.

La reacción de PCR usando marcadores tipo SCAR permitió diferenciar las especies según el tamaño de banda amplificado, en una sola reacción de PCR. Mientras que el método de amplificación de ITS, desarrollado por Ioos y Frey (2000), prolongó el tiempo de identificación, lo cual lo hace menos eficiente comparado con el primero.

Esta investigación identificó a *M. fructicola* como única especie causante de podredumbre morena en los cultivos nacionales de durazno analizados en Carchi, Imbabura, Tungurahua y Pichincha, usando dos tipos de marcadores moleculares. En Uruguay también se ha reportado que los cultivos de durazno tienen como agente de podredumbre morena a *M. fructicola* (Malvárez, *et al.*, 2004). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad que *M. laxa* y *M. fructigena* se encuentren en porcentajes mínimos infectando este tipo de frutales en el Ecuador, ya que el muestreo realizado en esta investigación no tuvo un número representativo de muestras a nivel nacional. Malvárez, *et al.* en su estudio realizado en el 2004 mencionan que estas dos especies pueden pasar desapercibidas en el caso de que se encontraran en los cultivos en porcentajes mínimos (alrededor del 1%).

La identificación temprana del agente causal de podredumbre morena en los frutales de durazno nacionales permite aumentar la productividad de éstos, implementando metodologías que controlen a *M. fructicola* en esta fruta y evitando que se expanda a nuevos cultivos que son susceptibles a éste fitopatógeno como manzanas, peras y claudias,

las cuales en muchos de los casos se cultivan en la misma área donde se encuentran los árboles de durazno.

## 10. Conclusiones

El aislamiento de *Monilinia* fue más eficiente a partir de frutos momificados que de frutos infectados.

El mejor medio para incrementar la cantidad de micelio del hongo fue el medio PDB, comparado con el medio PDA.

De los tres ensayos probados para la extracción de ADN del hongo a partir de micelio, el que tuvo mejor resultado fue el ensayo donde se realizó la maceración de micelio con buffer CTAB más Sand White Quartz.

La amplificación de regiones ITS utilizando primers específicos para cada especie de *Monilinia*, en reacciones individuales, arrojaron los mismos resultados que el PCR múltiple, usando primers tipo SCAR.

La identificación de especies usando marcadores SCAR es más eficiente para el diagnóstico de especies, ya que éstas pueden ser diferenciadas en una reacción única de PCR.

## 11. Recomendaciones

Ampliar el número de muestras y área de estudio para confirmar los resultados obtenidos en la presente investigación, aplicando el método de PCR múltiple, directamente del tejido infectado en cultivos de durazno y otros frutales susceptibles a *Monilinia spp.*

Realizar estudios para determinar la virulencia de las muestras que han sido caracterizadas molecularmente en este estudio como *M. fructicola* para mejorar el control en los cultivos, ya que no se tiene información sobre la patogenicidad de esta especie.

Determinar la variabilidad genética que *M. fructicola* tiene en el país, mediante el uso de marcadores moleculares como SSR o SNP para identificar si existen cepas dentro de la especie que afecten el cultivo de durazno en el Ecuador.

## 12. Bibliografía

Agrios, G. Fitopatología. Segunda Edición. México: Uteha Noriega Editores. 1995.

Cubero, José Ignacio. Introducción a la mejora genética vegetal. Madrid: Artes Gráficas Cuesta, S.A. 2002.

Coté, M.J, Tardif, M.C. y A.J. Meldrum. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fruticola*, *M. laxa* and *Monilinia polystroma* on Inoculated and Naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease*. 88:1219-1225. 2004.

Cundom, M. Gaiad, M. Castañón, M. Gutiérrez, Susana y Cautinho. Actividad antagónica in vitro de Hongos Saprofitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE (Biblioteca de la Facultad de investigación). 2000.

Desmond R. Layne y Daniele Bassi. *The Peach: Botany, production and uses*. Biddles: King's Lynn. 2008.

EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization, Diagnostic Protocol of *Monilinia fruticola*. 2009.

Estadísticas: Comercio Exterior; Banco Central del Ecuador. 2010-09-31. Consultado: 2010.10-28.  
<<http://bce.fin.ec>>

Fideghelli, C. Della Strada, G. Grassi, F. y G. Morico. The Peach industry in the world: present situation and trend. ISHS: International Society for Horticultural Science. IV International Peach Symposium. 2002.

Fulton, C.E., van Leeuwen, G.C.M. y A. Brown. Genetic variation among and within *Monilinia* species causing Brown rot of Stone and pome fruits. *European Journal of Plant Pathology* 105: 495-500, 1999.

Gell, I. Cubero, J. y P. Melgarejo. Two different PCR approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia spp.* In stone fruit trees. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

Gell, I. De Cal, A., Torres, T., Usall, J. y P. Melgarejo. 2008. Relationship between the incidence of latent infections caused by *Monilinia spp.* and the incidence of brown

- rot of peach fruit. Factors affecting latent infection. *Eur J Plant Pathol.* 121; 487-498.
- Gregorí, B. Estructura y actividad de los antifúngicos. Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar. *Rev. Cubana Farm;* 39 (2). 2005.
- Holst-Jensen, A. Kohn, L. Jakobsen, K. y Schumacher, T. 1997. Molecular Phylogeny and Evolution of *Monilinia* (Sclerotiniaceae) based on coding and noncoding RDNA sequences. *American Journal of Botany* 84 (5): 686-701.
- Hartman, John R. Peach fruit diseases. Plant Pathology Fact Sheet: University of Kentucky, College of Agriculture. 2007.
- Ioos Renaud y Pascal Frey, Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology* 106: 373-378, 2000.
- Lim, Tae y Byeongjin, Cha. Distribution of *Monilinia fructiocl*a isolates resistant to dicarboximide or to both procymidone and carbendazim in Korea. Department of Agricultural Biology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea. 2003.
- Malvárez, G. Rodríguez, A. Aguilar, C. Silveira, A, Silveira, E. Burgueño, J. y Mondino, P. *Monilinia fructicola*, the only *Monilinia* species currently causing brown rot of peach (*Prunus persica*) in Uruguay. *Fitopatología* 39 (3); 126-132. 2004.
- Mitidieri. M, Constantino. A, Brambilla. J, Gabilondo. Parra. E, Parra. M, Veron. R, Bimboni, G. Effect of different early/season sprays on blossom blight incidence and yield in peach orchards, San Pedro, Argentina. *Acta Horticulturae* 713: VI International Peach Symposium. 2005.
- Petróczy, M. y Palkovics, L. First report of *Monilinia polystroma* on Apple in Hungary. *Europe Journal Plant Pathology* 125: 343-347. 2009.
- Popenoe, Wylson. Economic Fruit-Bearing plants of Ecuador, United States National Herbarium. Vol. 24; Parte: 5. 1924.
- SIGAGRO. Ministerio de Agricultura, Ganadería Acuacultura y Pesca (MAGAP), 2010.

- Snyder, Christine y A.L. Jones. Genetic variation between strains of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. *Journal of Plant Pathology*. 21: 70-77 (1999).
- Streets, Rubert, The diagnosis of plant diseases. Tucson: The University of Arizona. 1982.
- Thomson, W.T. Agricultural Chemical Book IV-fungicides. Fresno. 1993-1994.
- USDA: Foreign Agricultural Service; Global Agricultural Information Network. 2010-05-10. Consultado: 2010-11-06.  
<<http://gain.fas.usda.gov>>
- USDA-FAS. "Economic, statistics and market information system".n.f. 2010-11-06  
<<http://www.fas.usda.gov>>
- Vienne, Dominique. Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology. Enfield-USA: Science publishers, INC.2002.
- Whealy K, Vásquez, W. y P. Viteri. Fruit berry and nut inventory. Third edition. United States: 2001.
- Willetts, H., Byrde R. y Fielding, A. 1977. The taxonomy of the Brown rot fungi related to their extracellular cell wall-degrading enzymes. *Journal of general Microbiology*, 103, 77-83.
- Zhou, T. Schneider, K y Xiu Zhen Li. Development of biocontrol agents from food microbial isolates for controlling post harvest peach brown rot caused by *Monilinia fructicola*. *International Journal of Food Microbiology* 126, 180-185. 2008.

### 13.Tablas

**Tabla 1.-** Frutos de durazno colectados en cuatro provincias de la sierra ecuatoriana.

Provincia	Muestra	Localidad	Variedad	Nº muestras		Origen
				FI	M	
Carchi	C01	Mira carretero *	Diamante	8	5	M
	C02	Mira *	Diamante	7	5	FI
	C03	El Ángel	N/C	3	2	M
	C04	Pisquer	Abridor	3	0	
Imbabura	I01	La Merced/Atuntaqui *	Nectarina	7	6	FI
	I02	Panavial Norte Km 3.5	Flax 4	4	5	M
	I03	Ibarra Centro/Mercado	Abridor	3	0	FI**
	I04	Ibarra	Diamante	6	5	FI
	I05	Guayavilla	Diamante	2	0	FI**
	I06	Chorlaví/Panavial Norte Km 3	Diamante	5	4	M
	I07	Pimampiro Mercado	Diamante	3	0	FI**
	I08	Peribuela *	Diamante	3	0	
	I09	Quitumba *	Diamante	2	0	
Pichincha	P01	INIAP/ Tumbaco *	Diamante	6	2	M
	P02	Sta. Rosa/ Tumbaco	Diamante	5	0	FI
	P03	Cayambe *	Diamante	5	3	FI
	P04	Cumbayá	Diamante	8	3	M
	P05	La Primavera / Cumbayá	Diamante	5	0	FI
	P06	La Tola/Tumbaco	Abridor	3	0	
	P07	Miravalle 3	Diamante	2	0	
Tungurahua	T01	Vía San Miguel	Abridor	3	0	FI
	T02	Pillaro-Centro *	Diamante	4	0	FI**
	T03	Cevallos Centro *	Diamante	4	5	FI**
	T04	Quero	Abridor	1	3	M
	T05	Pillaro/Mercado	Abridor	3	0	FI**
	T06	Mercado Ambato	Abridor	4	0	FI**
	T07	El Censo/Cevallos *	Abridor	2	0	
	T08	La Primavera/Cevallos *	Diamante	1	0	
	T09	Huainacuri	Diamante	3	0	
	T10	San Miguelito	Diamante	4	0	
	T11	Pillaro/Mercado	Diamante	2	0	
	T12	Quilán	Abridor	2	0	
	T13	Quero Caterretero	Diamante	1	2	
	T14	Huainacuri	Diamante	3	0	
<b>TOTAL</b>	34					

(\*): Plantación con más de 50 árboles productores de durazno.

(\*\*): Frutos infectados que fueron sometidos a cámara húmeda

Las muestras sombreadas corresponden a los aislamientos que fueron analizados molecularmente

**FI:** Fruto infectado

**M:** Momia



**Tabla 2.-** Set de primers utilizados para amplificación de regiones ITS

Nombre Primer <sup>a</sup>	Secuencias del primer (5'-3')	Tamaño de banda (bp)	Temperatura annealing(°C) <sup>b</sup>	Especie identificada
<i>ITS1 Mfcl</i>	TAT GCT CGC CAG AGG ATA ATT TGG GTT TTG GCA GAA GCA CAA T	350 pb	57°C (62,5 °C)	<i>M. fructicola</i>
<i>ITS1 Mlx</i>	TAT GCT CGC CAG AGA ATA ATC TGG GTT TTG GCA GAA GCA CAC C	350 pb	57°C (62,5 °C)	<i>M. laxa</i>
<i>ITS1 Mfgn</i>	CAC GCT CGC CAG AGA ATA ACC GGT GTT TTG CCA GAA GCA CAC T	350 pb	57°C (62,5 °C)	<i>M. frutigena</i>

<sup>a</sup> Nombre comercial del primer utilizado en este estudio

<sup>b</sup> Temperatura de annealing utilizada en este estudio. En paréntesis está la temperatura de annealing recomendada por Ioos y Frey (2000)

**Tabla 3.-** Set de primers utilizados para el PCR múltiple con primers tipo SCAR

Nombre Primer <sup>a</sup>	Secuencias del primer (5'-3')	Tamaño de banda (bp)	Temperatura annealing (°C) <sup>b</sup>	Especie identificada
<i>MO368-5</i>	GCA AGG TGT CAA AAC TTC CA	-----	63°C (60 °C)	-----
<i>MO368-8R</i>	AGA TCA AAC ATC GTC CAT CT	402 pb	63°C (60 °C)	<i>M. frutigena</i>
<i>MO368-8R</i>	AGA TCA AAC ATC GTC CAT CT	425 bp	63°C (60 °C)	<i>M. polystroma</i>
<i>MO368-10R</i>	AAG ATT GTC ACC ATG GTT GA	535 pb	63°C (60 °C)	<i>M. fructicola</i>
<i>MO368-R2</i>	TGC ACA TCA TAT CCC TCG AC	351 pb	63°C (60 °C)	<i>M. laxa</i>

<sup>a</sup> Nombre comercial de los primers usados en el estudio obtenidos de Cotè, *et. al*, 2004.

<sup>b</sup> Temperatura de annealing utilizada en esta investigación. En paréntesis está la temperatura recomendada por Cotè, *et. al*, 2004.

**Tabla 4.-** Comparación de características morfológicas usadas para la identificación de especies de *Monilinia* en medio PDA. Tomado de EPPO, 2009.

	<i>M. fructicola</i>	<i>M. laxa</i>	<i>M. fructigena</i>	<i>M. polystroma</i>
Colony colour	Hazel/isabelline ('grey')	Hazel/isabelline ('grey')	Yellow/cream	Yellow/cream
Growth in 24 h	9–20 mm	2–11 mm	0–12 mm	4–9 mm
Sporulation	Abundant	Sparse	Sparse	Sparse
Concentric ring of spores	Yes	No	Sometimes	Sometimes
Colony margin lobed	No	Yes	No	No
Colony rosetted	No (rare)	Yes	No	No
Rosettes with black arcs	No	Yes	No	No

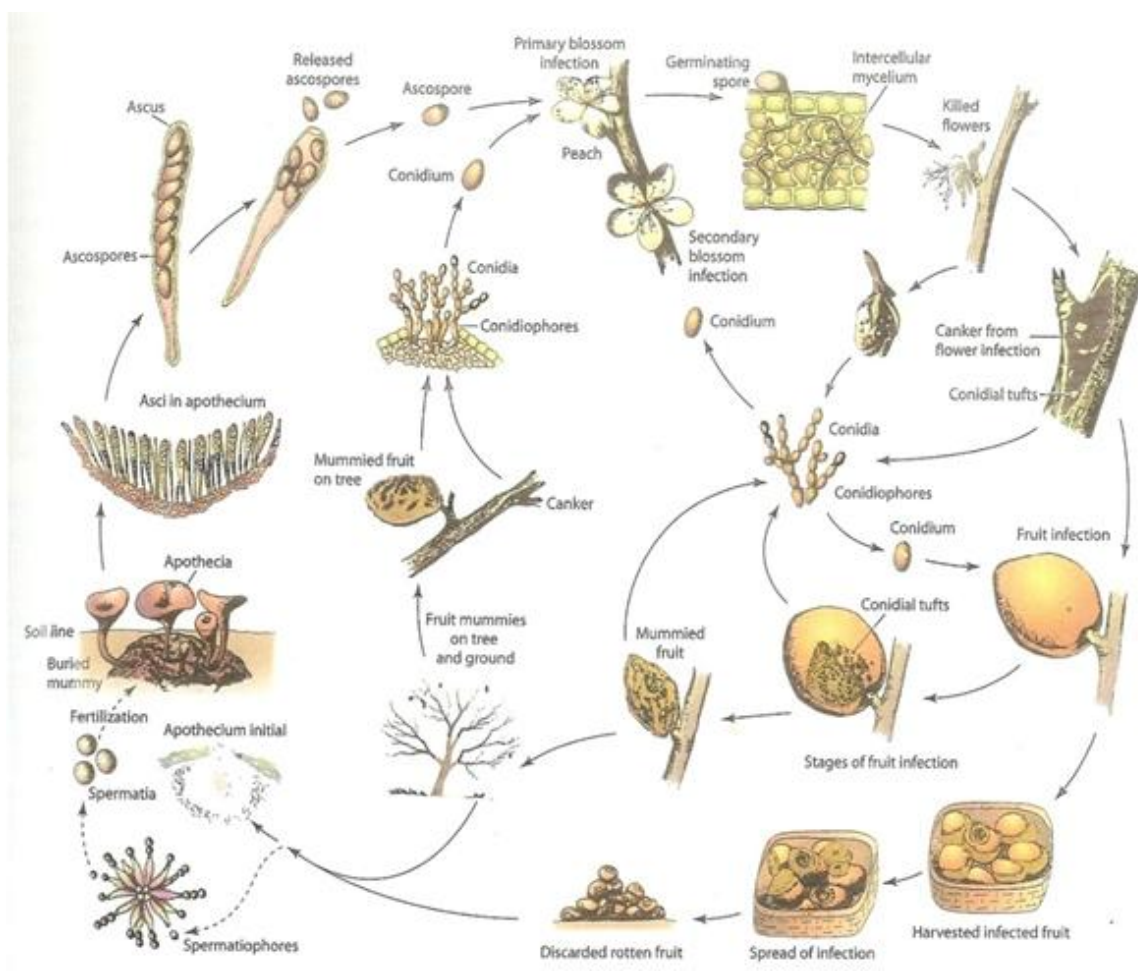
**Tabla 5.-** Cuantificación de ADN extraído en las 21 muestras analizadas molecularmente

<i>Provincia</i>	<i>Muestra</i>	<i>(ng/μl)</i>	<i>A260A/280</i>	<i>A260/A230</i>
El Carchi	C01	253	2,08	1,59
	C02	101,3	2,12	2,06
	C03	349,56	2,16	1,84
Imbabura	I01	220,83	2,21	2,18
	I02	179	2,04	1,66
	I03	1200,29	2,06	1,28
	I04	284,12	1,94	0,41
	I05	1051,4	2,17	2,22
	I06	359,24	2,13	1,36
	I07	1122,14	2,19	2,3
Pichincha	P01	299,11	2,06	0,44
	P02	60,76	2,1	1,66
	P03	690,69	2,17	2,35
	P04	1405	2,17	2,21
	P05	153,37	2,24	0,81
Tungurahua	T01	4218, 23	1,98	2,12
	T02	747	2,03	1,83
	T03	1718, 56	2,56	1,82
	T04	675,19	2,15	2,19
	T05	1432,57	2,15	2,33
	T06	1407,26	2,19	2,38
TOTAL	21			

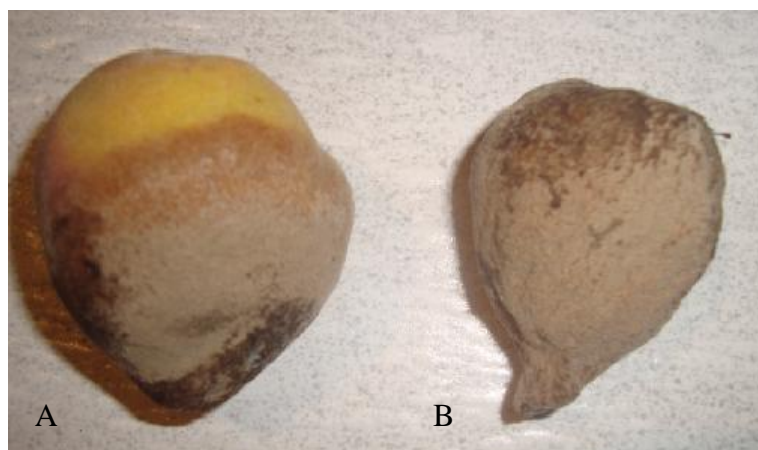
**Tabla 6.-** Aislamientos identificados como *M. fructicola* después de realizar los análisis moleculares correspondientes, usando primers ITS y SCAR.

		Amplificación <i>M. fructicola</i>		
<i>Provincia</i>	<i>Muestra</i>	ITS	SCARs	Total
El Carchi	C01	+	+	2
	C02	-	-	
	C03	+	+	
Imbabura	I01	+	+	4
	I02	+	+	
	I03	+	+	
	I04	-	-	
	I05	-	-	
	I06	+	+	
	I07	-	-	
Pichincha	P01	+	+	4
	P02	+	+	
	P03	-	-	
	P04	+	+	
	P05	+	+	
Tungurahua	T01	-	-	1
	T02	-	-	
	T03	-	-	
	T04	+	+	
	T05	-	-	
	T06	-	-	
TOTAL	21			11

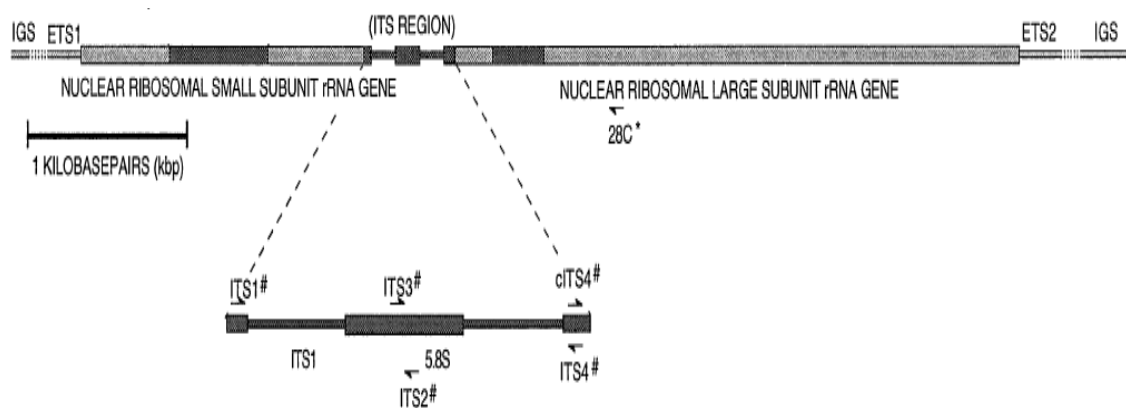
## 14. Figuras



**Figura 1.-** Fases sexuales y asexuales de *Monilinia* spp. dentro del ciclo de infección de Podredumbre Morena. Tomado de Agrios, 1995.



**Figura 2.-** Desarrollo de sintomatología y momificación de fruto. A: Fruto de durazno atizonado. B: Fruto de durazno momificado



**Figura 3.-** Mapa del rRNA nuclear. En dirección 5'-3' se muestra en orden: la unidad pequeña rRNA nuclear, seguido del intrón ITS1, el exón 5.8S rDNA, la región ITS2 y la subunidad larga del rRNA nuclear. Tomado de Holst-Jense, 1997.



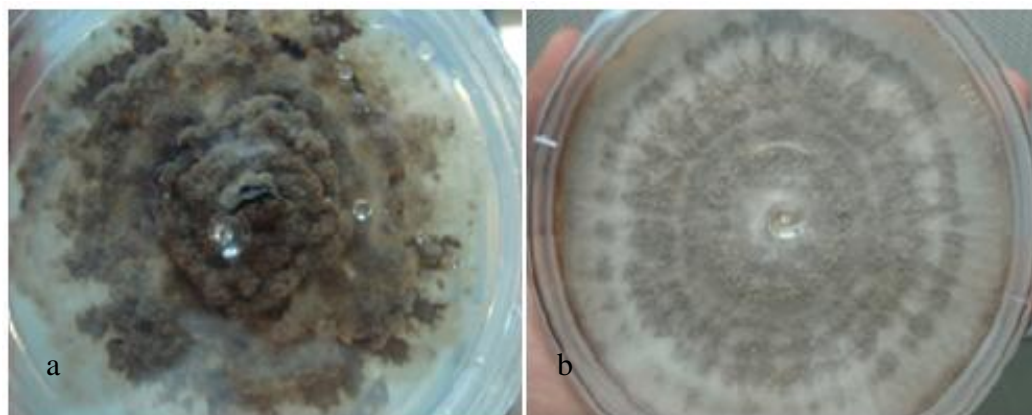
**Figura 4.-** Morfología de conidios de *Monilinia spp.* observados al microscopio (40X) del aislamiento I01.



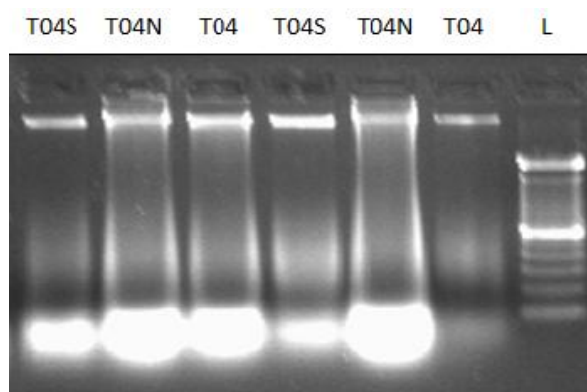
**Figura 5.-** Aislamiento I07, donde se observa la ausencia de micelio del hongo *Monilinia* y la abundancia de esporas en medio V8-MA, después de dos semanas de subcultivo.



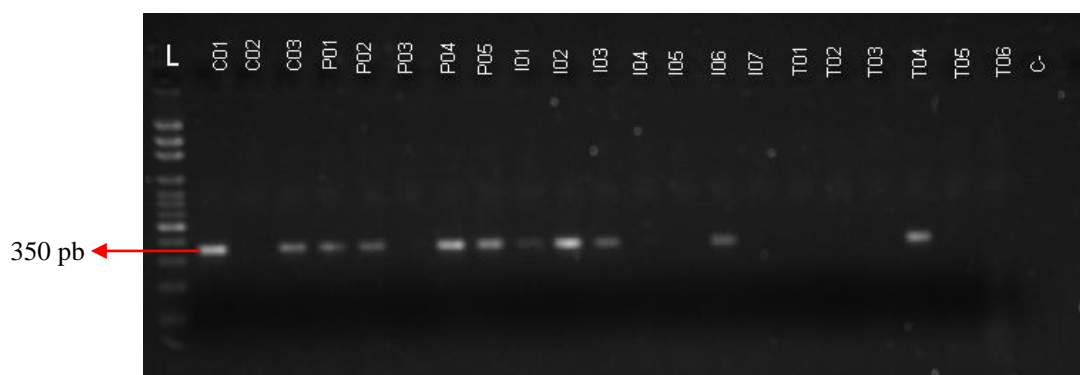
**Figure 6.-** Aislamiento T04, en donde se observa el crecimiento de micelio y la presencia de esporas de *Monilinia* en el borde del cultivo a medida que el hongo se expande en medio V8-MA.



**Figura 7.-** Patrón de crecimiento de micelio del aislamiento I03 de *Monilinia* (a) margen del micelio es lobulado en medio PDA (b) crecimiento del micelio es concéntrico en medio V8-MA.

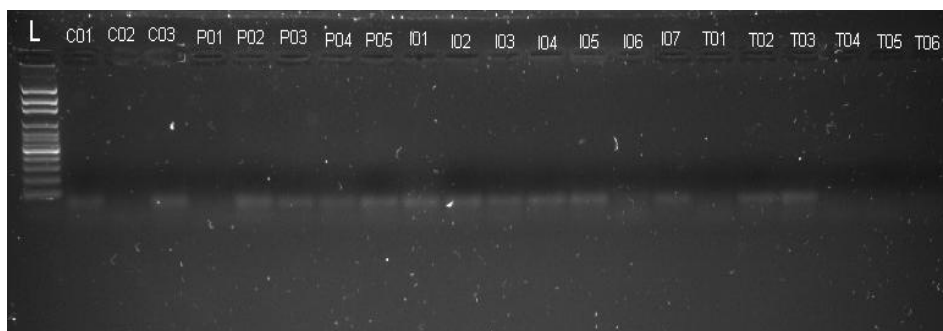


**Figura 8.-** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% donde se observa la concentración y calidad de ADN genómico extraído usando tres variables en el protocolo de extracción de ADN para hongos a partir del crecimiento de micelio de la muestra T04 en medio PDB. T04: maceración de micelio con CTAB; T04S: maceración de micelio con Sand White Quartz y Buffer CTAB; T04N: maceración de micelio con Nitrógeno líquido y CTAB.

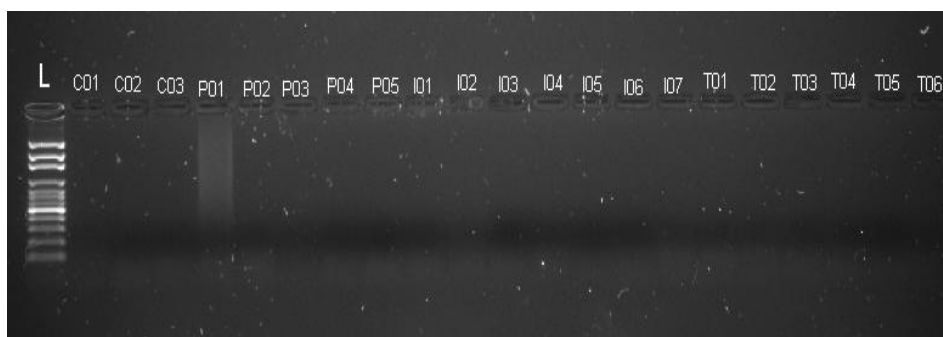


**Figura 9.-** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% donde se observa la amplificación de la región ITS para la especie de *Monilinia fructicola* en 11 de las 21 muestra analizadas. El ladder 100pb (Axygen) se presenta en el primer carril, seguido de las 21 muestra analizadas y el último pocillo corresponde al control negativo.

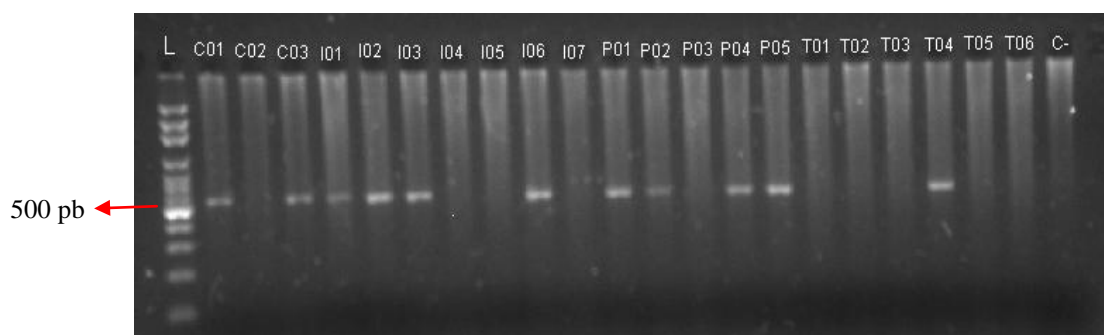




**Figura 10.-** Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Ladder de 100pb (Axygen). Ausencia de amplificación de la región ITS en la reacción de PCR utilizando primers específicos para *Monilinia fructigena*.



**Figura 11.-** Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Ladder de 100pb (Axygen). Ausencia de amplificación utilizando primers específicos para las regiones ITS de la especie *Monilinia laxa*.



**Figura 12.-** En el primer carril se observa el ladder 100pb (Axygen) y en los siguientes 21 carriles se encuentran las muestras analizadas en el estudio. El último carril corresponde al control negativo. De las 21 muestras analizadas 11 fueron identificadas como *Monilinia fructicola* mediante la reacción de PCR múltiple, usando primers tipo SCAR en un gel de Agarosa 1,5%.

## 15. Anexos

### Anexo 1.- Composición de medio V8-MA (1L)

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
L-Aspargina	1g
Carbonato de Calcio	3g
Estracto de Malta	10g
Maltosa	20g
Agar	15g
Juego V8- vegetales	200 ml
Agua destilada	1000 mL
Gentamicina	40mg/mL

### Anexo 2.- Composición del medio de cultivo PDB (100mL)

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
PDB en polvo	2,4 g
Agua destilada	100mL
Gentamicina	40mg/mL

### Anexo 3.- Composición del medio PDA (100mL)

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
PDB en polvo	24 g
Agua destilada	1000 mL
Gentamicina	40mg/mL