

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

MANCHA FOLIAR POR GLOMERELLA EN MANZANO: IDENTIFICACIÓN DE  
ESPECIES Y ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

por

Vanessa CUOZZO RUCCI

Valentina MARTÍNEZ SABAJ

TESIS presentada como uno  
de los requisitos para obtener  
el título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO

URUGUAY

2016

Tesis aprobada por:

Director: \_\_\_\_\_  
Dr. Ing. Agr. Pedro Emilio Mondino Hintz

\_\_\_\_\_  
Dra. Ing. Agr. Sandra María Alaniz Ferro

\_\_\_\_\_  
Dra. Ing. Agr. Ana Elisa Silvera Pérez

Fecha: 30 de diciembre de 2016

Autores: \_\_\_\_\_  
Vanessa Cuozzo Rucci

\_\_\_\_\_  
Valentina Martínez Sabaj

## AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias, por su constante apoyo durante nuestros años de estudio.

A nuestros amigos, compañeros e integrantes de las Cátedras de Viticultura y Entomología por acompañarnos en las distintas instancias de la carrera.

Al productor Julio Yaquina que nos dejó trabajar en su predio, permitiéndonos la obtención de las muestras para llevar a cabo este trabajo.

A todos los integrantes del grupo de trabajo de la Cátedra de Fitopatología, en especial a la Lic. Laura Hernández, por su colaboración en el trabajo de laboratorio y su disponibilidad para ayudarnos.

A nuestros tutores Pedro Mondino y Sandra Alaniz, por compartir sus conocimientos y brindarnos su tiempo durante la realización de esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VII
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u>.....</b>	<b>1</b>
1.1. <u>OBJETIVOS</u> .....	2
1.1.1. <u>Objetivo general</u> .....	2
1.1.2. <u>Objetivos específicos</u> .....	2
<b>2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....</b>	<b>3</b>
2.1. <u>EL CULTIVO DE MANZANO</u> .....	3
2.2. <u>ENFERMEDADES QUE AFECTAN EL MANZANO</u> .....	4
2.3. <u>MANCHA FOLIAR POR GLOMERELLA CAUSADA POR</u> <u><i>Colletotrichum spp</i></u> .....	6
2.3.1. <u>Descripción de síntomas y signo</u> .....	7
2.3.2. <u>Agentes causales</u> .....	7
2.3.3. <u>Ciclo de la enfermedad</u> .....	9
2.3.4. <u>Epidemiología</u> .....	10
2.4. <u>MANEJO DE LA MANCHA FOLIAR POR GLOMERELLA</u> .....	10
2.4.1. <u>Control cultural</u> .....	11
2.4.2. <u>Control químico</u> .....	11

3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	12
3.1. DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS Y SIGNO EN HOJAS Y FRUTOS.....	13
3.2. OBTENCIÓN DE LOS AISLADOS.....	13
3.2.1. <u>Aislamiento a partir de hojas</u> .....	13
3.2.2. <u>Aislamiento a partir de frutos</u> .....	14
3.2.3. <u>Conservación de los aislados</u> .....	15
3.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS.....	17
3.3.1. <u>Extracción de ADN</u> .....	17
3.3.2. <u>Amplificación por PCR y secuenciación</u> .....	18
3.3.3. <u>Análisis filogenéticos</u> .....	19
3.4. ENSAYOS DE PATOGENICIDAD.....	21
3.4.1. <u>Obtención del inóculo</u> .....	21
3.4.2. <u>Patogenicidad en hojas desprendidas</u> .....	21
3.4.3. <u>Patogenicidad en brotes jóvenes</u> .....	22
3.4.4. <u>Patogenicidad en frutos</u> .....	23
3.5. DESCRIPCIÓN DE LAS PRIMERAS ETAPAS DEL PROCESO INFECCIOSO EN HOJAS.....	24
4. <u>RESULTADOS</u> .....	26
4.1. DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS Y SIGNO EN HOJAS Y FRUTOS.....	26
4.2. OBTENCIÓN DE LOS AISLADOS.....	28

4.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS.....	29
4.3.1. <u>Amplificación por PCR</u> .....	29
4.3.2. <u>Análisis filogenéticos</u> .....	30
4.4. ENSAYOS DE PATOGENICIDAD.....	32
4.4.1. <u>Patogenicidad en hojas desprendidas</u> .....	32
4.4.2. <u>Patogenicidad en brotes jóvenes</u> .....	33
4.4.3. <u>Patogenicidad en frutos</u> .....	35
4.5. DESCRIPCIÓN DE LAS PRIMERAS ETAPAS DEL PROCESO INFECCIOSO EN HOJAS.....	37
5. <u>DISCUSIÓN</u> .....	39
6. <u>CONCLUSIONES</u> .....	42
7. <u>RESUMEN</u> .....	43
8. <u>SUMMARY</u> .....	44
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	45

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Figura No.		Página
1.	Vista del monte donde se detectó por primera vez la presencia de la enfermedad en Uruguay.....	12
2.	Proceso de aislamiento del patógeno a partir de los frutos.....	14
3.	Proceso de conservación de todos los aislados.....	15
4.	Discos foliares para observación de la germinación de ascosporas en microscopio.....	25
5.	Síntoma y signo en hoja característico de la MFG.....	27
6.	Observación al microscopio de las estructuras fructíferas y esporas de <i>Colletotrichum</i> spp.....	28
7.	Productos amplificados mediante PCR utilizando los cebadores GDF1/GDR1.....	29
8.	Uno de los árboles con mayor parsimonia obtenido del análisis de la región GADPH de todos los aislados obtenidos de manzano y secuencias de especies filogenéticamente cercanas extraídas del GenBank.....	31
9.	Patogenicidad en hojas desprendidas.....	33
10.	Patogenicidad en brotes jóvenes.....	35
11.	Patogenicidad en frutos.....	36

12.	Crecimiento de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp obtenidos mediante el re-aislamiento del patógeno a partir de las lesiones en frutos.....	37
13.	Visualización del proceso de germinación de ascosporas en el tejido foliar.....	38

Tabla No.

1.	Superficie implantada, no. de plantas en producción y producción (ton) de manzana según grupos de variedades en Uruguay.....	4
2.	Descripción de los aislados obtenidos a partir de hojas y frutos de manzano.....	16
3.	Secuencias obtenidas del GenBank utilizadas en el análisis filogenético.....	20
4.	Inoculación de hojas desprendidas: especie, aislados seleccionados, tipos de esporas inoculadas y concentración de la suspensión de esporas obtenida (mL <sup>-1</sup> ).....	22
5.	Inoculación de brotes jóvenes: especie, aislados seleccionados, tipos de esporas inoculadas y concentración de la suspensión de esporas obtenida (mL <sup>-1</sup> ).....	23
6.	Inoculación de frutos: especie, aislados seleccionados, tipos de esporas inoculadas y concentración de la suspensión de esporas obtenida (mL <sup>-1</sup> ).....	24



## **1. INTRODUCCIÓN**

El cultivo del manzano es el frutal de hoja caduca de mayor importancia en el mundo. En nuestro país ocupa el 50% de la superficie destinada a los frutales. La producción está ubicada principalmente en el sur del país, en los departamentos de Montevideo, Canelones, San José y Colonia (MGAP. DIEA, 2015).

Las variedades más plantadas en el Uruguay pertenecen al grupo de las rojas con un 63% de la superficie, siendo las principales variedades Red Chief, Red Delicious, Early Red One y Top Red. A este grupo le sigue en importancia con un 23% las bicolors, conformado principalmente por Cripp's Pink, Royal Gala y Fuji. En menor proporción se encuentra el grupo de las manzanas verdes, representado por la variedad Granny Smith con un 10% (MGAP. DIEA, 2016).

Entre las principales enfermedades que afectan al cultivo de manzano se destacan la sarna del manzano y la podredumbre amarga (PA).

Por otra parte, la mancha foliar por *Glomerella* (MFG), causada por hongos del género *Colletotrichum*, constituye una enfermedad nueva en Uruguay. Esta enfermedad fue observada por primera vez en 2014, en un monte comercial de manzano ubicado en el departamento de San José (Casanova et al.<sup>1</sup>); siendo hasta el momento en el único predio donde se ha constatado su presencia. De extenderse la MFG en los cultivos comerciales de manzano del país provocaría grandes pérdidas económicas, ya que su importancia radica en que afecta tanto el área foliar como los frutos. Las manchas foliares y la extensa defoliación genera el debilitamiento de las plantas, limitando la acumulación de reservas para los ciclos siguientes, mientras que las lesiones en los frutos afectan directamente la calidad estética y comercial.

Este trabajo se propuso realizar un estudio exhaustivo de esta enfermedad, comenzando por describir con precisión los síntomas y signos en hojas y frutos y obtener una colección de aislados monospóricos provenientes de hojas y frutos con síntomas. Además se pretendió comprobar la patogenicidad reproduciendo los síntomas en hojas y frutos inoculando tanto con conidios como con ascosporas. Se identificaron los aislados de la colección mediante técnicas moleculares y se observaron las características de las primeras etapas de la infección por ascosporas.

---

<sup>1</sup> Casanova, L. s.f. First report of *Glomerella* leaf spot of apple caused by *Colletotrichum fructicola* in Uruguay. s.p. (en prensa).

## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. Objetivo general**

Generar conocimientos de la etiología y aspectos epidemiológicos de la Mancha Foliar por *Glomerella*, una nueva enfermedad del manzano ocasionada por especies de hongos del género *Colletotrichum*.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- 1) Describir detalladamente los síntomas, en hojas y frutos de manzano, de la enfermedad conocida como Mancha Foliar por *Glomerella*.
- 2) Obtener una colección de aislados monospóricos de *Colletotrichum* spp. a partir de hojas y de frutos con síntomas de Mancha Foliar por *Glomerella* e identificarlos mediante análisis filogenético.
- 3) Verificar la patogenicidad de los aislados mediante inoculación de hojas y frutos sanos con ascosporas y conidios.
- 4) Describir las primeras etapas del proceso infeccioso en hojas observando la formación de estructuras infectivas a partir de las ascosporas.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. EL CULTIVO DE MANZANO**

El cultivo del manzano (*Malus x domestica* Borkh) es el frutal de hoja caduca de mayor importancia en el mundo. Los datos disponibles más recientes muestran que en el año 2012 se produjeron en el mundo 80.822.521 toneladas en un área cultivada de 5.217.722 hectáreas. El principal país productor es China continental con una producción de 37.001.590 toneladas para ese mismo año, seguido por Estados Unidos con 4.110.046 de toneladas (FAO, 2016).

En Uruguay la superficie de frutales de hoja caduca es de 5,4 miles de hectáreas (datos de la zafra 2014-2015), siendo el manzano quien ocupa el primer lugar con 2.703 hectáreas que representan el 50% de la superficie total destinada a estos frutales. La producción de manzanas se ubica principalmente en el sur del país, en los departamentos de Montevideo, Canelones, San José y Colonia (MGAP. DIEA, 2015).

Del total de 786 productores de frutales de hoja caduca existentes al año 2015, 473 incluyen al manzano dentro de sus rubros de producción. Las variedades más plantadas en el Uruguay pertenecen al grupo de las manzanas rojas, siendo Red Chief, Red Delicious, Early Red One y Top Red las principales, con el 63% de la superficie, seguidas con un 23% por el grupo de las manzanas bicolors, en su mayoría Cripp's Pink, Royal Gala y Fuji, y en menor proporción el grupo de las manzanas verdes representado por la variedad Granny Smith con un 10% (MGAP. DIEA, 2016). Los detalles de la producción de manzana según variedades, superficie implantada, número de plantas y producción se presentan en la Tabla 1.

En la temporada 2014-2015 la producción total de manzanas en Uruguay fue de 55.454 toneladas, siendo sus principales destinos el mercado de frutas frescas en un 77%, la industria en un 16% y un 7% la exportación. (MGAP. DIEA, 2016). El Valor Bruto de Producción (VBP) del total de las especies caducas fue de U\$S 60.306.000 para la zafra 2011/2012 de los cuales 27.833.000 dólares (46%) corresponden a lo aportado por la producción de manzana (MGAP. DIEA, 2012).

**Tabla 1. Superficie implantada, no. de plantas en producción y producción (ton) de manzana según grupos de variedades en Uruguay.**

<b>Variedades</b>	<b>Superficie Hectáreas</b>	<b>%</b>	<b>Plantas en producción (miles)</b>	<b>Producción (Ton.)</b>
Rojas	1706	63	1219	28259
Bicolores	622	23	1061	14546
Granny Smith	285	10	213	7861
Otras	143	4	151	2096
<b>TOTAL</b>	<b>2756</b>	<b>100</b>	<b>2644</b>	<b>52762</b>

Fuente: MGAP. DIEA (2015).

## **2.2. ENFERMEDADES QUE AFECTAN EL MANZANO**

El cultivo del manzano es afectado por diversas enfermedades que dificultan su producción. Entre ellas se destacan la sarna del manzano y la podredumbre amarga.

La sarna del manzano, cuyo agente causal es el hongo *Venturia inaequalis* (Cooke), es considerada la enfermedad más importante de este cultivo en Uruguay. Esto es debido a que en el país existen condiciones climáticas muy favorables para su desarrollo. *V. inaequalis* necesita de la ocurrencia de lluvia para la liberación de sus esporas y de la presencia de agua libre sobre hojas y frutos para poder infectar. Las primaveras lluviosas con frecuentes precipitaciones favorecen la ocurrencia de períodos de infección. Este hongo afecta a todos los órganos verdes de la planta (hojas, pecíolos, flores y frutos), siendo los síntomas más evidentes las manchas foliares y las costras sobre la fruta (Mondino et al., 2009b).

Al atacar las hojas disminuye el área foliar de la planta dando como resultado menores rendimientos, sin embargo el daño más grave es ocasionado sobre la fruta ya que al producir costras no solo se afecta su desarrollo, sino que además pierde calidad comercial. Para evitar las infecciones los agricultores se ven obligados a realizar numerosas aplicaciones de fungicidas desde el momento de brotación de los manzanos (mediados de setiembre) hasta que finaliza el período de liberación de esporas (mediados de diciembre) (Mondino y Alaniz, 2009a).

En segundo lugar en importancia se encuentra la podredumbre amarga (PA) causada por distintas especies de hongos del género *Colletotrichum*. Dos especies han sido tradicionalmente citadas como las causantes de la podredumbre amarga; *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y *C. acutatum* J.H. Simmonds. En los últimos años la taxonomía del género *Colletotrichum* fue revisada y las especies reagrupadas en complejos de especies (Weir et al. 2012, Damm et al. 2012a, 2012b). Recientemente en Uruguay se han identificado a *C. fructicola* (especie predominante), *C. theobromicola*, *C. melonis* y *C. paranaense* como las especies causantes de la PA (Stadnik et al.<sup>2</sup>, Alaniz et al. 2015). Las dos primeras pertenecen al complejo de especies de *C. gloeosporioides*, mientras que las dos últimas al complejo de especies de *C. acutatum*.

La PA es una enfermedad que solamente afecta a los frutos, siendo el síntoma característico una pudrición blanda, deprimida, de color marrón y de tamaño variable que puede avanzar en profundidad en forma cónica, pudiendo desarrollarse varias de estas lesiones por fruto. Sobre la zona afectada se producen acérvulos dispuestos en forma de anillos concéntricos sobre los cuales se producen masas de conidios de color salmón o pardo oscuro a negruzcas (Mondino et al., 2009b).

La mayor incidencia ocurre durante el verano y si bien todas las variedades de manzana son susceptibles, las más afectadas son aquellas de cosecha tardía como Cripp's Pink, Granny Smith y Fuji (Alaniz et al., 2015).

El hongo sobrevive de una estación a la otra como peritecios y acérvulos en frutos momificados y como micelio en canchales, heridas de la corteza y madera muerta. Las ascosporas y los conidios son liberados y transportados por el viento y las gotas de lluvia respectivamente, y depositados sobre la superficie de los frutos donde pueden penetrar tanto por heridas como directamente a través de la cutícula (Schubert 1983, Crusius et al. 2002, Mondino et al. 2009b, Casanova 2015).

El manejo de la PA está basado en la implementación de prácticas culturales, tendientes a la reducción del inóculo inicial y secundario, y en la aplicación de fungicidas (Schubert 1983, Illinois University 2005).

---

<sup>2</sup> Stadnik, M.J. s.f. Genetic and pathogenic diversity of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in Southern Brazil and Uruguay. s.p. (en prensa).

Dentro de las prácticas culturales la eliminación de frutos enfermos, resulta la medida más efectiva en nuestro país (Casanova, 2015). Otras medidas propuestas incluyen la eliminación de frutos momificados, ramas con canchales y madera de poda (Sutton 1990, Sanhueza et al. 2002, Illinois University 2005).

Una segunda enfermedad causada por hongos del género *Colletotrichum* en manzano, denominada mancha foliar por *Glomerella* (MFG), fue dada a conocer por Taylor en los EEUU en el año 1971 (Taylor, 1971). En Brasil, esta enfermedad apareció en el año 1983 (Sutton y Sanhueza, 1998). Recientemente fue citada su aparición en China (Wang et al., 2012) y en Korea (Cheon et al., 2016). Las pérdidas atribuidas a esta enfermedad son superiores al 75% (Becker et al. 2000, Denardi et al. 2003).

La presencia de esta enfermedad por primera vez en Uruguay fue confirmada por Casanova et al.<sup>1</sup> en un predio frutícola de manzanas ubicado en la zona de Kiyú, en el departamento de San José.

### **2.3. LA MANCHA FOLIAR POR GLOMERELLA CAUSADA POR *Colletotrichum* spp.**

La MFG, también denominada mancha de la Gala (por ser ésta una variedad muy sensible), es una enfermedad que afecta a algunas variedades de manzanos. Fue descrita por primera vez por Taylor (1971) en el estado de Georgia, Estados Unidos, afectando plantas del cultivar Golden Delicious. Taylor al comunicar la existencia de esta nueva enfermedad describe la sintomatología en hojas, sin embargo los síntomas en frutos no los diferencia de los de la PA. Posteriormente fue citada su presencia en el cultivar Gala, en 1998, en los estados de Tennessee, Carolina del Norte y Georgia (González y Sutton, 2005).

En Brasil su presencia fue constatada por primera vez en el estado de Paraná en el año 1983 por Leite et al. (1988) en el cultivar Gala y sus clones (Hamada, 2013). En agosto de 2011 apareció en China, en la provincia de Fengxian, Jiangsu, afectando cultivares de Gala, Golden Delicious y Qinguan (Wang et al., 2012). Recientemente, en 2013 y 2014 se comunicó su presencia en Korea en la provincia de Gyeongbuk (Cheon, 2016). En este caso Cheon describe la sintomatología típica de MFG en frutos, pero no asocia la presencia de síntomas en hojas a esta enfermedad. Una enfermedad similar ocurre en perales y fue encontrada por primera vez en Japón y recientemente en China y Korea (Fukaya 2004, Du et al. 2015, Zhang et al. 2015).

En Uruguay, la enfermedad fue reportada por primera vez en el año 2015 por Casanova et al.<sup>1</sup>, en un predio frutícola ubicado en la zona de Kiyú, en el departamento de San José. Se encontró afectando manzanos de las variedades Cripp's Pink y Brasil Gala.

### **2.3.1. Descripción de síntomas y signo**

A diferencia de lo que ocurre con la PA, donde el único síntoma observado es una podredumbre blanda del fruto que abarca amplios sectores del mismo, las poblaciones de *Colletotrichum* spp. que causan la MFG causan pequeñas lesiones en frutos y ocasionan manchas en las hojas y defoliación (Hamada, 2013).

Los síntomas de MFG en frutos se caracterizan por ser lesiones pequeñas que varían de 1 a 3 mm de diámetro, circulares, necróticas, deprimidas y con borde o halo rojizo. Estas lesiones no profundizan en la pulpa más de 1 a 2 mm y la zona afectada tiene aspecto corchoso. Las lesiones no aumentan de tamaño y no evolucionan a podredumbre (Casanova et al.<sup>1</sup>, Sanhueza et al. 2002, Wang et al. 2012, Hamada 2013).

En las hojas los síntomas iniciales son pequeñas manchas de 1 a 3mm de diámetro, que varían de coloración púrpura a violácea, sin borde definido y distribuidas aleatoriamente en el limbo de la hoja. Posteriormente evolucionan a manchas necróticas irregulares de mayor tamaño (1-2cm) y se produce la coalescencia de las mismas llegando a cubrir toda la hoja. Sobre las zonas afectadas en las hojas suelen encontrarse puntuaciones negras correspondientes a la presencia de acérvulos o peritecios (Casanova et al.<sup>1</sup>, Sutton y Sanhueza 1998, Sanhueza et al. 2002, Wang et al. 2012, Hamada 2013). Las hojas afectadas toman coloración amarillenta y finalmente caen. Estas ondas de abscisión pueden resultar en más de un 70% de defoliación al momento de la cosecha o incluso previo a ésta (Sutton y Sanhueza, 1998). Como consecuencia de la fuerte defoliación se compromete la producción del año siguiente ya que el mantenimiento de las hojas en los frutales de hoja caduca es imprescindible para la acumulación de reservas necesarias para iniciar el siguiente ciclo (Hamada, 2013).

### **2.3.2. Agentes causales**

La MFG ha sido atribuida a especies del género *Colletotrichum*. En los últimos años la sistemática de este género ha sufrido cambios muy importantes. Tradicionalmente la identificación de las especies se ha realizado en base a la forma y tamaño de los conidios, producción de peritecios (Freeman et al.,

2000), crecimiento de las colonias en medio PDA (Sutton et al., 1992), y sensibilidad al fungicida Benomyl (Valero et al., 2010).

Recientemente, en base a exhaustivos análisis filogenéticos se determinó que la mayoría de las especies del género *Colletotrichum* se agrupan en complejos de especies (Cannon et al., 2012). Por otra parte, las especies cercanas dentro de los complejos, suelen presentar escasas diferencias fenotípicas y estas a su vez, varían considerablemente con las condiciones ambientales (Cai et al., 2009). Por esta razón, los métodos de identificación basados exclusivamente en métodos convencionales, han dejado de ser confiables. Los métodos convencionales sí resultan útiles para ubicar los aislados dentro de los complejos (Phoulivong et al. 2010, Alaniz et al. 2015).

Actualmente, la determinación de las especies, se realiza mediante técnicas moleculares en combinación con la caracterización morfológica y test de patogenicidad (Phoulivong et al., 2012).

La región ITS ha sido frecuentemente utilizada para la identificación de especies de *Colletotrichum* (Freeman et al., 2000), pero su sola aplicación ha dado resultados poco satisfactorios (Cannon et al., 2012). Por esta razón se han agregado otras regiones génicas como la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) y la Beta tubulina (TUB2), para optimizar la identificación de especies de *Colletotrichum* dentro de los complejos de especies (Weir et al. 2012, Damm et al. 2012a, 2012b).

Taylor (1971), adjudica la enfermedad a *Glomerella cingulata*, que se corresponde con el estado perfecto o teleomorfo de *C. gloeosporioides*. Bonetti y Katsurayama (1999), citan a *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y una tercera especie no identificada de *Colletotrichum* spp. causando la MFG en Brasil.

Recientemente en Brasil, en la región de Santa Catarina se ha identificado a *C. fructicola* y *C. karstii* causando la MFG, siendo *C. fructicola* la especie predominante (Velho et al. 2014, Velho et al. 2015, Rockenbach et al. 2016).

Por su parte, en China, Wang y colaboradores comunican la presencia de la enfermedad atribuyéndola a *C. gloeosporioides* (Wang et al., 2012), posteriormente un segundo grupo de investigación identifica a *C. fructicola* y *C. aenigma* causando la MFG en manzanos (Wang et al., 2015) mientras que en Korea, Cheon et al. (2016) atribuyen a *C. gloeosporioides* el provocar una sintomatología similar a la de MFG en frutos, aunque no menciona la existencia de síntomas en hojas asociados a esta enfermedad.



En Uruguay, síntomas de MFG aparecieron por primera vez en 2014 y fue reportada por primera vez en el año 2015 por Casanova et al.<sup>1</sup>, en un predio frutícola ubicado en la zona de Kiyú, en el departamento de San José. Se observó afectando cultivos de Cripp's Pink y Brasil Gala, ambas variedades susceptibles (Alaniz et al., 2015) y la especie encontrada fue *C. fructicola*. Hasta el momento éste es el único predio en Uruguay donde se ha detectado la presencia de esta enfermedad.

### **2.3.3. Ciclo de la enfermedad**

Según Crusius et al. (2002), la sobrevivencia, del patógeno causante de la MFG, ocurre principalmente en las ramas y yemas pero no sobrevive en hojas caídas en el suelo ni frutos momificados. Sin embargo, Hamada (2013) afirma que las hojas y frutos en descomposición son una importante fuente de inóculo inicial. También Sutton y Sanhueza (1998), indican que la principal fuente de inóculo primario son las hojas que quedan en el suelo del ciclo anterior en las que se forman los peritecios que liberan ascosporas.

La combinación de la ocurrencia de lluvias con períodos de hoja mojada es esencial para la diseminación del hongo y desarrollo de la infección. Esta enfermedad se disemina por medio de esporas, tanto por conidios como por ascosporas. Los conidios son liberados y diseminados por acción de las lluvias mientras que las ascosporas son liberadas por las lluvias y diseminadas por las corrientes de aire, además ambos tipos de esporas requieren presencia de agua libre o de humedad relativa elevada (>90%) para germinar e iniciar así el proceso de infección (Sanhueza et al., 2002).

Durante el verano, sobre las manchas foliares se producen estructuras reproductivas de *Colletotrichum* (acérvulos y peritecios) que liberan esporas produciendo ciclos secundarios de infección (Sutton y Sanhueza, 1998).

El proceso de infección del género *Colletotrichum* comienza con la llegada y posterior fijación de los conidios a la superficie del hospedero, continuando con la germinación, la producción de apresorios y la penetración de la epidermis. Posteriormente se produce el crecimiento del micelio y la colonización del tejido (Casanova, 2015).

Las esporas una vez germinadas ingresan por heridas o penetran directamente a través de la epidermis vegetal mediante el desarrollo de apresorios, y para ello requieren presencia de agua libre o alta humedad relativa (Casanova, 2015).

El hongo al iniciar la colonización de los tejidos vegetales, produce

lesiones necróticas, sobre las que luego se formarán las estructuras reproductivas (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

#### **2.3.4 Epidemiología**

La MFG es considerada una enfermedad policíclica (Hamada, 2013). Una vez que las primeras infecciones en hojas ocurren, se desarrollan manchas y sobre las mismas se forman acérvulos y peritecios. Los acérvulos exudan masas de conidios que por salpicado del agua de lluvia alcanzan otras hojas y frutos de la misma planta o plantas vecinas (Crusius et al. 2002, Sanhueza et al. 2002, Hamada 2013). Las ascosporas durante la lluvia son eyectadas al aire y por esta vía alcanzan a otras plantas. La ocurrencia de lluvias durante el verano favorece la ocurrencia de ciclos secundarios de infección (Hamada, 2013).

Las infecciones por estos hongos pueden iniciarse a partir del período de floración en años más bien cálidos y húmedos, y extenderse durante toda la temporada de verano, siendo la temperatura y la humedad los principales factores ambientales condicionantes para el desarrollo de la enfermedad (Sutton y Sanhueza 1998, Crusius et al. 2002, Sanhueza et al. 2002, Hamada 2013, Velho et al. 2015).

Según Crusius et al. (2002), la gravedad de la enfermedad aumenta de forma proporcional al incremento en la temperatura en el rango entre los 14 a 28°C, en tanto a 34°C la infección se inhibe completamente.

En relación al período de hoja mojada requerido para la infección, este autor establece que a 30°C el período de hoja mojada requerido es de dos horas, mientras que a 14°C es de 24 hs; es por esto que la duración del período de hoja mojada parece ser el factor más limitante en el desarrollo de la MFG. Otro factor de importancia es la lluvia, ya que de esta depende la liberación de las esporas, tanto conidios como ascosporas.

El período de incubación (desde la inoculación hasta la aparición de síntomas) es muy corto, cerca de 45 horas para las hojas y 96 horas para los frutos (Sanhueza et al., 2002).

#### **2.4 MANEJO DE LA MANCHA FOLIAR POR GLOMERELLA**

No existen en la actualidad medidas de control totalmente eficaces para esta enfermedad, sino que las prácticas de manejo utilizadas se basan sobre todo en la reducción de cualquier fuente de inóculo para el siguiente año (Velho et al., 2015).

Su control se dificulta debido principalmente a su rápido desarrollo, teniendo en cuenta su corto período de incubación de apenas dos días (Crusius et al., 2002).

#### **2.4.1 Control cultural**

Según Sanhueza et al. (2002), en las condiciones de producción integrada de Brasil, las prácticas de control más importantes están relacionadas con el manejo de las plantas y la prevención de la enfermedad. Algunas de las prácticas utilizadas tienen como objetivo evitar el desarrollo foliar excesivo y mejorar la ventilación dentro de las plantas a través de poda y nutrición balanceada. Retirar y quemar los restos de poda podrían también contribuir a eliminar posibles fuentes de inóculo.

El uso de cultivares resistentes podría ser otro método de control, sin embargo, muchos genotipos resistentes a MFG no son los más apreciados por los consumidores (Velho et al., 2015).

#### **2.4.2 Control químico**

La estrategia de control químico utilizada en Brasil, país más próximo donde se encuentra presente la enfermedad, es básicamente preventiva debido a la falta de fungicidas con acción curativa. Realizan en promedio 16 pulverizaciones por temporada, a intervalos de 10 días y cuando la lluvia acumulada supera los 30mm, desde final de floración hasta la poscosecha (Sanhueza et al., 2002).

Los fungicidas más utilizados para el control de MFG son los del grupo Dithiocarbamatos (mancozeb, metiram y propineb), Estrobirulinas y Benzimidazoles (Sanhueza et al. 2002, Hamada 2013).

En nuestro país no existen antecedentes de ensayos de control con fungicidas ni productos registrados para tal fin.

Si en Uruguay ocurriera una eventual diseminación de la MFG a toda la región de producción de manzano, se vería afectado su manejo debido a la ausencia de estrategias de control ajustadas y a la limitante en los tiempos de espera de los productos químicos, sobre todo por la mayor incidencia de la enfermedad próxima a cosecha. Dado que en el país se ha logrado eliminar las aplicaciones de verano para el control de sarna, y el control de PA se reduce a aplicaciones puntuales en años favorables, esto implicaría reincorporar intervenciones fitosanitarias en esta época.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio realizado se llevó a cabo en un predio frutícola perteneciente al Sr. Julio Yaquina, ubicado en la Ruta 1 km 64, localidad de Kiyú, en el departamento de San José. En dicho predio fue encontrada por primera vez en Uruguay la enfermedad denominada MFG.

Los cuadros afectados son montes comerciales de manzana, de la variedad Cripp's Pink, con la variedad Brasil Gala como polinizadora. El monte fue implantado en el año 2005, con un marco de plantación de 1,2m x 4,0m y conducido en líder central (Figura 1).



Las filas que presentan defoliación anticipada corresponden a la variedad Brasil Gala. La variedad principal es Cripp's Pink. La conducción es en líder central y el marco de plantación es de 1,2m x 4,0m.

**Figura 1. Vista del monte donde se detectó por primera vez la presencia de la enfermedad en Uruguay.**

### **3.1 DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS Y SIGNO EN HOJAS Y FRUTOS**

Durante el verano del 2015 se realizaron visitas periódicas al predio afectado, entre febrero y abril. En ellas se recorrieron los montes afectados, se tomaron fotografías de frutos y hojas con síntomas de MFG en diferentes estadios de avance, tanto sobre la planta como de las hojas caídas en el suelo. También se tomaron fotografías panorámicas de los árboles defoliados como consecuencia de la enfermedad.

Durante las visitas se colectaron muestras en forma aleatoria de diferentes partes del monte y de distintas partes de la planta. Las muestras de hojas y frutos con síntomas, fueron colocadas en bolsas de papel, identificándose según el lugar de origen, variedad a la que pertenecían los órganos muestreados y fecha. Posteriormente fueron llevadas al laboratorio de Fitopatología y acondicionadas en heladera a 4°C hasta su procesamiento.

En el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía se realizó una observación detallada de los síntomas y signos, con la ayuda de lupa y microscopio.

### **3.2. OBTENCIÓN DE LOS AISLADOS**

#### **3.2.1. Aislamiento a partir de hojas**

La obtención de aislados monospóricos se realizó directamente a partir de hojas enfermas. Para ello se observaron bajo lupa hojas afectadas, procurando encontrar estructuras reproductivas (acérvulos o peritecios) con aspecto de puntuaciones negras ubicadas sobre las manchas.

Una vez detectada la presencia de estructuras se procedió a extraer una de ellas para ser observada bajo el microscopio a los efectos de confirmar de que se tratara de un acérvulo o peritecio de *Colletotrichum*. Una vez confirmada la presencia del hongo, se extrajeron nuevas estructuras reproductivas de la misma mancha con la ayuda de aguja hipodérmica. Se colocaron en un tubo de 2 ml con 100 µL de agua destilada estéril (ADE). El tubo fue agitado en vórtex por 1 minuto para facilitar la descarga de las esporas. A continuación la suspensión de esporas se sembró en superficie con ayuda de asa de Drigalski sobre placas con medio PDA (Oxoid, Inglaterra) enmendado con sulfato de estreptomina (400 mg/L<sup>-1</sup>) (Sigma- Aldrich, China). Las placas fueron colocadas en estufa termostatizada e incubadas en oscuridad a 24°C por 24 horas.

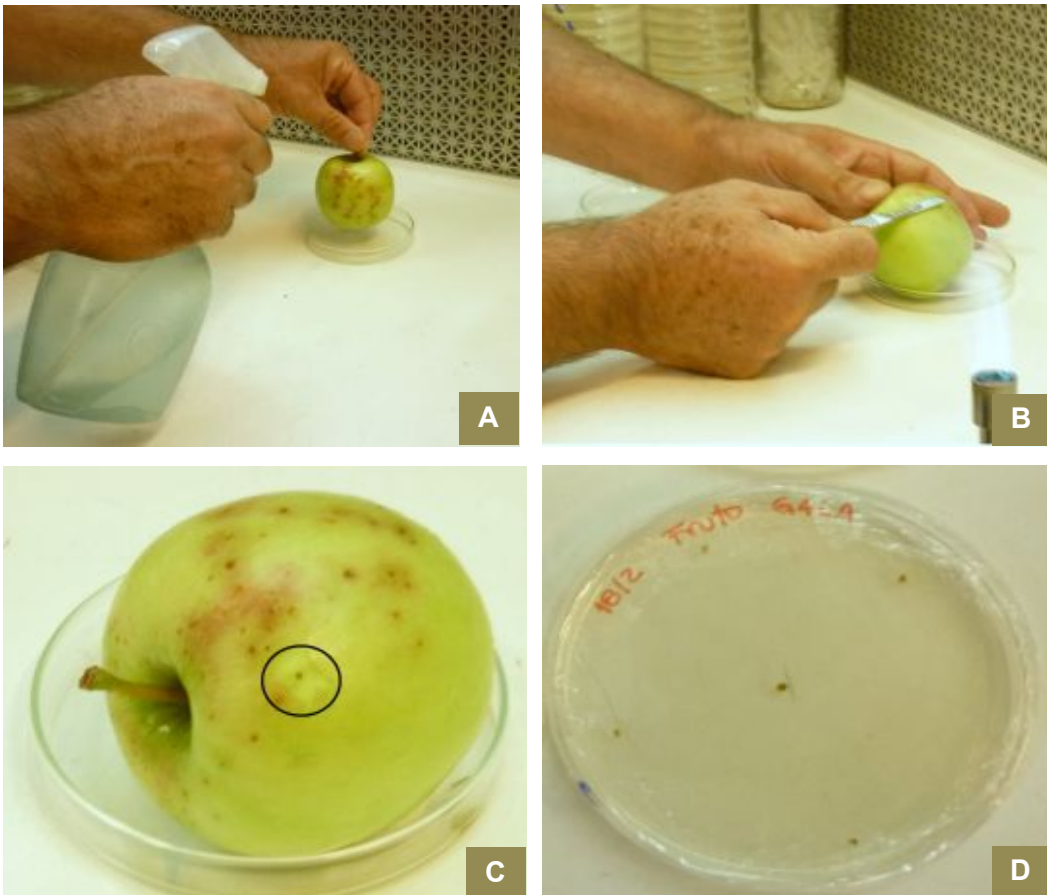
Posteriormente se procedió a repicar una única espora germinada

utilizando aguja hipodérmica. Este procedimiento se realizó en la cabina de flujo laminar con la ayuda de lupa y microscopio.

### **3.2.2. Aislamientos a partir de frutos**

Los frutos con síntomas fueron desinfectados superficialmente con alcohol 70° y se dejaron secar en la cabina de flujo laminar. Mediante bisturí se retiró la piel del fruto que cubría la lesión de forma de dejar expuesta una pequeña zona interna afectada. Esa pequeña porción de tejido expuesto fue retirada con aguja hipodérmica y sembrada en placa con medio PDA (Figura 2).

En este caso se asumió que cada lesión es ocasionada por una única espora por lo que se consideró que cada aislado debería ser homogéneo genéticamente.



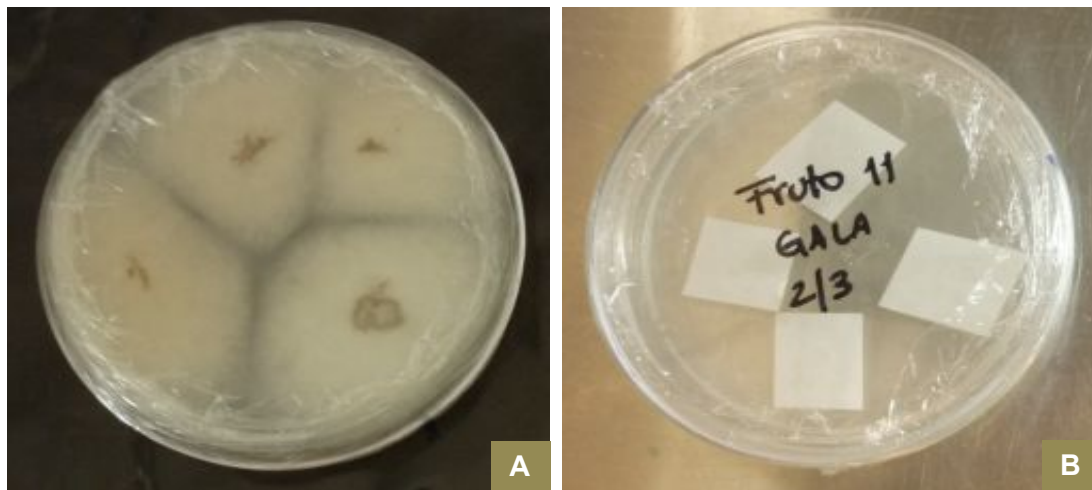
**Desinfección superficial con alcohol 70° (A). Retirado de la piel del fruto con bisturí (B) y extracción de la zona interna afectada (C). Siembra de las lesiones en medio PDA (D).**

**Figura 2. Proceso de aislamiento del patógeno a partir de los frutos.**

### **3.2.3. Conservación de los aislados**

Una vez obtenidos los aislados, se los repicó a placas de Petri con medio PDA e inmediatamente se colocaron en superficie 5 trozos de papel de filtro estéril de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> con el fin que el hongo colonizara los mismos. Los papeles una vez colonizados fueron retirados y colocados en sobres de papel estériles. Inmediatamente se procedió a deshidratarlos colocándolos en un recipiente cerrado conteniendo sílica gel por al menos 10 días, para finalmente conservarlos en freezer a -20°C (Figura 3).

Los 29 aislados obtenidos se sumaron a una colección de 18 aislados ya existentes en el Laboratorio de Fitopatología, completándose así una colección de 47 aislados que fueron utilizados en este trabajo. Los 18 aislados existentes en la colección provenían en su totalidad de hojas con síntomas, de las variedades Brasil Gala y Cripp's Pink del mismo predio y fueron aislados en la temporada anterior (verano de 2014).



**Crecimiento del hongo en medio PDA (A), posterior repique del hongo en medio PDA con papeles de filtro estériles (B).**

**Figura 3. Proceso de conservación de todos los aislados.**

En la tabla 2 se presentan los 47 aislados de *Colletotrichum* utilizados para este trabajo de tesis, detallándose sus características más relevantes.

**Tabla 2. Descripción de los aislados obtenidos a partir de hojas y frutos de manzano.**

<b>Especie</b>	<b>Aislado</b>	<b>Año de colecta</b>	<b>Variedad</b>	<b>Órgano</b>
<i>C. fructicola</i>	H48	2014	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H49	2014	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H50	2014	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H52	2014	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H53	2014	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H54	2014	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H56	2014	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H57	2014	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H58	2014	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H60	2014	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H61	2014	Cripp's Pink	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H63	2014	Cripp's Pink	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H64	2014	Cripp's Pink	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H66	2015	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H67	2015	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H68	2015	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	H69	2015	Gala	Hoja
<i>C. fructicola</i>	F70	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F71	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F72	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F73	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F74	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F75	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F76	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F78	2015	Gala	Fruto

(Continúa en la siguiente página)



(Continúa de la página anterior)

<i>C. fructicola</i>	F79	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F80	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F81	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F82	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F83	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F84	2015	Gala	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F85	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F86	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F87	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F88	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F89	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F90	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F91	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F92	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F93	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F94	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. fructicola</i>	F95	2015	Cripp's Pink	Fruto
<i>C. karstii</i>	H51	2014	Gala	Hoja
<i>C. karstii</i>	H55	2014	Gala	Hoja
<i>C. karstii</i>	H59	2014	Gala	Hoja
<i>C. karstii</i>	H62	2014	Cripp's Pink	Hoja
<i>C. karstii</i>	H65	2014	Gala	Hoja

---

### 3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS

#### 3.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio y esporas de cada uno de los aislados monospóricos crecidos en placas con medio PDA durante 14 días a 24°C en oscuridad. Se utilizó el protocolo de extracción según Palocci et al. (1999) con modificaciones, el mismo se describe a continuación.

Para cada uno de los aislados se raspó la colonia crecida con una espátula estéril y se colocó en microtubos de 1.5 mL. Inmediatamente se agregaron 200µl de buffer de lisis (200mM Tris HCl pH 7.5; 250mM NaCl, 0.5% SDS, 25mM EDTA+NaOH al 10%) y se mantuvieron en freezer por al menos 2 horas.

A continuación se agregaron otros 200µl de buffer de lisis y se agitó por 10 segundos utilizando un vórtex; después se mantuvieron en baño seco a 65°C por 30 minutos. Posteriormente se agregaron 300µl de NaCl 1M+0.1v/v Twing y se invirtieron los tubos suavemente para homogeneizar. Se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se agregó 1 volumen de isopropanol a -20°C y luego se mezcló y colocó en freezer por al menos 30 minutos. Luego se centrifugó a 10.000 rpm por 5 minutos y se volcó el sobrenadante.

Una vez finalizado esto, se agregó 200µl de etanol 70% a -20°C y se centrifugó por 2 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Se volvió a volcar el sobrenadante. El pellet se secó por lo menos 2 horas a temperatura ambiente o en estufa a 50°C hasta que se evaporara totalmente el alcohol. Luego se re-suspendió el pellet en 50µl de TE y se llevó a baño seco a 65°C por 15 minutos. Por último se almacenó el ADN obtenido en los microtubos en freezer a -20°C.

### **3.3.2. Amplificación por PCR y secuenciación**

Con el objetivo de identificar los aislados hasta nivel de especie, para cada uno de ellos se amplificó, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el gen glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) utilizando los cebadores GDF1 (59-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-39) y GDR1 (59-GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT-39) diseñados por Guerber et al. (2003).

La mezcla de reacción estuvo conformada por 1X de buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,2 µM de cada dNTPs, 0,4 µM de cada uno de los cebadores, 1U de U-Taq ADN polimerasa (SBS Genetech Co. Ltd., China) y 1 µl de la solución del ADN extraído. La mezcla se completó con agua ultrapura (MilliQ) hasta alcanzar un volumen final de 20 µL.

Las amplificaciones se realizaron utilizando un termociclador MultiGene™ Mini (Labnet Internacional Inc., Estados Unidos) en las condiciones descritas a continuación: desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 34 ciclos compuestos por desnaturalización a 94°C durante 45 s, hibridación a

57°C por 30 s y 45 s de extensión a 72°C. El último paso fue 72°C por 10 min para completar las extensiones.

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis. Para ello se tomaron muestras de 2 µL de cada uno de los productos amplificados y se corrieron en un gel de agarosa (AMRESCO®, Estados Unidos) al 1,5% en tampón TBE 0,5X (TBE 1X = tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH=8,0). En la corrida se incluyó un marcador de peso molecular constituido por una mezcla de bandas de ADN (Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder Plus, Fermentas, Alemania).

Para la visualización de las bandas, los geles se tiñeron en solución acuosa con GelRed™ (Biotium, Estados Unidos) (5 µL GelRed, 2 mL NaCl 0,1 M y 48 mL de agua) por al menos 30 minutos. Luego fueron expuestos a luz UV en transiluminador (DyNA Light Dual Intensity UV Transiluminator, Labnet Internacional Inc., Estados Unidos). Los geles fueron fotografiados con un sistema de foto documentación DigiDoc-It™ (Ultra-Violet Products Ltd., Reino Unido).

Los productos de amplificación obtenidos fueron secuenciados en el Instituto Pasteur de Montevideo.

### **3.3.3. Análisis filogenéticos**

Las secuencias de ADN obtenidas se alinearon mediante el programa informático Clustal W (Larkin et al., 2007) incluido en el programa MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011). Posteriormente las secuencias se editaron con ayuda de los cromatogramas.

Dentro del alineamiento fueron incluidas secuencias génicas de especies similares o filogenéticamente cercanas obtenidas del GenBank, preferentemente correspondiente a aislados ex-type (Tabla 3). Para el análisis filogenético se utilizó el método de Máxima Parsimonia. Para la reconstrucción filogenética los espacios o gaps resultantes del alineamiento no fueron tenidos en cuenta ("complete deletion"). El soporte de los nodos de los árboles más parsimoniosos se obtuvo mediante 1000 réplicas de bootstrap.

**Tabla 3. Secuencias obtenidas del GenBank utilizadas en el análisis filogenético.**

<b>Especie</b>	<b>Complejo</b>	<b>Accession No.</b>	<b>País de origen</b>	<b>Huésped</b>
<b><i>Colletotrichum anellatum</i></b>	<b>Boninense</b>	<b>CBS 129826</b>	<b>Colombia</b>	<b><i>Hevea indica</i></b>
<b><i>Colletotrichum petchii</i></b>	<b>Boninense</b>	<b>CBS 37894</b>	<b>Italia</b>	<b><i>Dracaena marginata</i></b>
<i>Colletotrichum petchii</i>	Boninense	CBS 118193	China	<i>Dracaena sanderana</i>
<b><i>Colletotrichum phyllanthi</i></b>	<b>Boninense</b>	<b>CBS 175.67</b>	<b>India</b>	<b><i>Phyllanthus acidus</i></b>
<i>Colletotrichum karstii</i>	Boninense	CBS 128500	Nueva Zelanda	<i>Annona cherimola</i>
<i>Colletotrichum karstii</i>	Boninense	CBS 106.91	Brasil	<i>Carica papaya</i>
<b><i>Colletotrichum boninense</i></b>	<b>Boninense</b>	<b>CBS 123755</b>	<b>Japón</b>	<b><i>Crinum asiaticum</i></b>
<i>Colletotrichum boninense</i>	Boninense	CBS 128547	Nueva Zelanda	<i>Camellia sp.</i>
<b><i>Colletotrichum aenigma</i></b>	<b>Gloeosporioides</b>	<b>ICMP 18608</b>	<b>Israel</b>	<b><i>Persea americana</i></b>
<i>Colletotrichum aenigma</i>	Gloeosporioides	ICMP 18686	Japón	<i>Pyrus pyrifolia</i>
<b><i>Colletotrichum gloeosporioides</i></b>	<b>Gloeosporioides</b>	<b>ICMP 17821</b>	<b>Italia</b>	<b><i>Citrus sinensis</i></b>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Gloeosporioides	ICMP 18678	EE.UU	<i>Pueraria lobata</i>
<b><i>Colletotrichum fructicola</i></b>	<b>Gloeosporioides</b>	<b>ICMP 18581</b>	<b>Tailandia</b>	<b><i>Coffea arabica</i></b>

(Continúa en la siguiente página)

(Continúa de la página anterior)

<i>Colletotrichum fructicola</i>	Gloeosporioides	ICMP 17787	Brasil	<i>Malus domestica</i>
<b><i>Colletotrichum nupharicola</i></b>	<b>Gloeosporioides</b>	<b>ICMP 18187</b>	<b>EE.UU</b>	<b><i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>Polysepala</i></b>
<i>Colletotrichum nupharicola</i>	Gloeosporioides	ICMP 17940	EE.UU	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>Polysepala</i>

\* Las secuencias destacadas en negrita corresponden a aislados ex-type, ex-holotype y/o ex-epitype.

### 3.4 ENSAYOS DE PATOGENICIDAD

La patogenicidad de los aislados se verificó mediante inoculación en hojas y frutos. Los ensayos se realizaron inoculando hojas desprendidas y brotes en floreros, de acuerdo a la metodología descrita por Velho et al. (2015), y también frutos cosechados. Para las inoculaciones se utilizaron suspensión de esporas tanto de origen sexual (ascosporas) como asexual (conidios).

#### 3.4.1. Obtención del inóculo

Todos los aislados obtenidos fueron puestos a crecer en medio PDA a 24°C en estufa termostatazada, por 15 días aproximadamente. Con el fin de inducir la esporulación, durante ese tiempo fueron sometidos a una combinación de luz blanca visible y luz ultravioleta cercana con 12 horas de fotoperíodo. Los aislados utilizados desarrollaron estructuras fructíferas, tanto de origen sexual (peritecios) como asexual (acérvulos), en cantidad suficiente para obtener una suspensión con una adecuada concentración de esporas.

A cada placa se le adicionó 10 ml de ADE y se procedió a remover las esporas mediante raspado con asa de Drigalsky. La suspensión de esporas que se obtuvo se filtró con gasa estéril. Se determinó mediante observación bajo microscopio el tipo de espora predominante en la suspensión (ascosporas o conidios). A continuación se midió la concentración de esporas en cámara de Neubauer y se ajustó hasta lograr una concentración de entre 1 y 5 x10<sup>5</sup> ml<sup>-1</sup>.

#### 3.4.2. Patogenicidad en hojas desprendidas

Se colectaron brotes jóvenes de la variedad Brasil Gala de un monte comercial en Melilla sin antecedentes de la enfermedad. Una vez en el

laboratorio se seleccionaron hojas jóvenes completamente desarrolladas. Para evitar la deshidratación, el pecíolo se envolvió con algodón húmedo. Posteriormente se colocaron las hojas de forma individual en placas de Petri de vidrio sobre un papel de filtro estéril humedecido con 2 ml de ADE para proporcionar humedad. Las hojas se asperjaron con la suspensión de esporas de aquellos aislados seleccionados para la inoculación (Tabla 4). Se realizaron tres repeticiones para cada uno de los cinco aislados seleccionados. Además se incluyó un testigo inoculado únicamente con ADE. Todas las placas fueron conservadas en el solarío del Laboratorio de Fitopatología a 24°C, por al menos tres semanas. Diariamente, se observaron hasta constatar la aparición de los síntomas.

**Tabla 4. Inoculación de hojas desprendidas: especie, aislados seleccionados, tipos de esporas inoculadas y concentración de la suspensión de esporas obtenida (mL<sup>-1</sup>).**

<b>Especie</b>	<b>Aislado seleccionado</b>	<b>Tipo de espora inoculada</b>	<b>Concentración de esporas (esporas mL<sup>-1</sup>)</b>
<i>C. fructicola</i>	H53	Ascosporas	1,2x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	H64	Ascosporas	2,5x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	F71	Ascosporas	2,5x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	F84	Ascosporas	1x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	H54	Conidios	4x10 <sup>5</sup>

### **3.4.3. Patogenicidad en brotes jóvenes**

Para 5 aislados seleccionados se realizó una prueba de patogenicidad en brotes de manzano. Para ello se colectaron brotes jóvenes, de aproximadamente 20 cm de largo, de árboles de la variedad Brasil Gala del mismo monte comercial ubicado en Melilla.

Los brotes fueron colocados individualmente en recipientes de vidrio con arena y agua. Se inocularon 5 brotes (repeticiones) con cada aislado y 5 brotes fueron utilizados como testigos inoculados con ADE (Tabla 5).

La inoculación se realizó con aspersor manual a cada brote humedeciendo las hojas hasta punto de goteo con la suspensión de esporas. Los brotes así inoculados se cubrieron individualmente con bolsas de polietileno transparentes previamente humedecidas en su interior mediante aspersión de

ADE. Las bolsas se mantuvieron durante el tiempo que duró el ensayo. La inoculación de los brotes utilizados como testigo se realizó de forma similar, con la diferencia que se asperjó con ADE. Todos los brotes fueron conservados en el solarío del Laboratorio de Fitopatología a 24°C, por aproximadamente un mes, y fueron observados diariamente para registrar la aparición de síntomas.

**Tabla 5. Inoculación de brotes jóvenes: especie, aislados seleccionados, tipos de esporas inoculadas y concentración de la suspensión de esporas obtenida (mL<sup>-1</sup>).**

<b>Especie</b>	<b>Aislado seleccionado</b>	<b>Tipo de espora inoculada</b>	<b>Concentración de esporas (esporas mL<sup>-1</sup>)</b>
<i>C. fructicola</i>	H49	Ascosporas	2,5x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	H64	Ascosporas	2,5x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	F71	Ascosporas	5x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	F84	Ascosporas	1x10 <sup>5</sup>
<i>C. karstii</i>	H51	Conidios	5x10 <sup>5</sup>

#### **3.4.4. Patogenicidad en frutos**

Se colectaron frutos sin síntomas de MFG de la variedad Cripp's Pink procedentes de un monte comercial de Melilla. Estos frutos se colectaron 30 días previos a la fecha estimada de cosecha, al inicio del cambio de color, de modo de evitar una posible resistencia ontogénica.

Para el ensayo se seleccionaron 50 de estos frutos los que fueron desinfectados superficialmente con alcohol 70°. Previo a la inoculación, los frutos se colocaron sobre papel mojado con ADE, en cajas de plástico. Se asperjó la superficie de cada uno de los frutos hasta punto de goteo con la suspensión de esporas de los aislados seleccionados (Tabla 6), sin realizarles ningún tipo de herida. Se realizaron cinco repeticiones para cada uno de los aislados, el testigo solamente se asperjó con ADE.

Las cajas se conservaron semi-cerradas en el solarío del Laboratorio de Fitopatología a 24°C durante un mes y medio. Los frutos fueron observados diariamente para constatar la presencia de síntomas.

**Tabla 6. Inoculación de frutos: especie, aislados seleccionados, tipos de esporas inoculadas y concentración de la suspensión de esporas obtenida (mL<sup>-1</sup>).**

<b>Especie</b>	<b>Aislado seleccionado</b>	<b>Tipo de espora inoculada</b>	<b>Concentración de esporas (esporas mL<sup>-1</sup>)</b>
<i>C. fructicola</i>	H53	Ascosporas	1,2x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	H66	Ascosporas	2,5x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	H69	Ascosporas	1,5x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	H49	Ascosporas	2,5x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	H64	Ascosporas	2,5x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	F71	Ascosporas	2,5x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	F84	Ascosporas	1x10 <sup>5</sup>
<i>C. fructicola</i>	H54	Conidios	4x10 <sup>5</sup>
<i>C. karstii</i>	H51	Conidios	5x10 <sup>5</sup>

Por último, con el objetivo de completar los Postulados de Koch, se realizó el re-aislamiento del patógeno a partir de los síntomas reproducidos en los frutos inoculados.

Para esto, en aquellos frutos inoculados en los que se observaron lesiones características de la enfermedad, se procedió de la misma manera que para el aislamiento inicial. Se extrajo la zona interna de las manchas utilizando un bisturí estéril y se sembraron en placas con medio PDA. Estas placas fueron incubadas en estufa termostata a 24°C durante 15 días, y se observaron periódicamente para constatar el crecimiento del hongo.

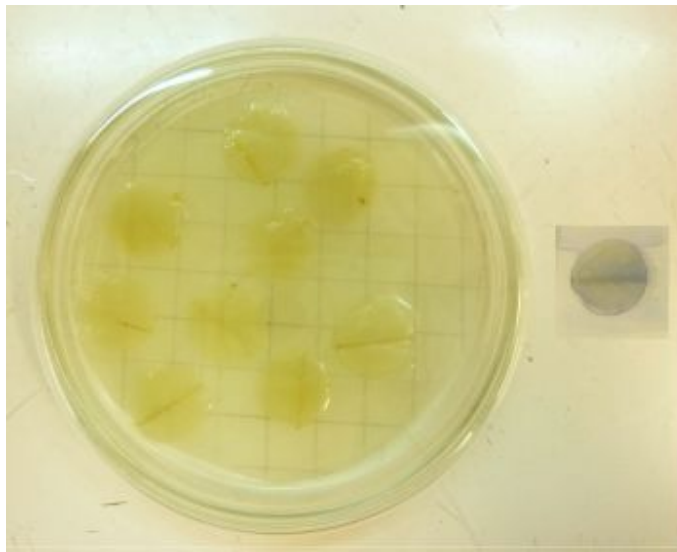
### **3.5 DESCRIPCIÓN DE LAS PRIMERAS ETAPAS DEL PROCESO INFECCIOSO EN HOJAS**

La observación de la formación de los tubos germinativos y apresorios, a partir de las ascosporas se realizó utilizando la técnica de Stadnik y Buchenauer (2000).

Se cortaron discos de tejido foliar inoculado con ascosporas, utilizando un sacabocado de 1,5 cm de diámetro. Los discos fueron colocados en una placa de Petri de vidrio con papel de filtro estéril en su base. A continuación se



le agregó la solución I (Etanol/ácido acético glacial; 3:1, v/v) para la fijación y el aclaramiento de los tejidos y se conservó la placa a 4°C. Transcurridas 24 horas, se hicieron tres cambios de esta solución cada dos horas. Posteriormente se agregó la solución II de Lactoglicerol (ác.láctico, glicerol y agua) para continuar el aclaramiento y la conservación. Por último las estructuras del hongo fueron teñidas con azul de anilina en lactofenol (0,1%) para su visualización en microscopio óptico (Figura 4).



**Discos de tejido foliar una vez finalizado el proceso de aclaramiento y un disco foliar teñido con azul de anilina pronto para su observación en microscopio (derecha de la imagen).**

**Figura 4. Discos foliares para observación de la germinación de ascosporas en microscopio.**

**(Fuente: adaptación de la metodología de Stadnik y Buchenauer, 2000).**

## **4. RESULTADOS**

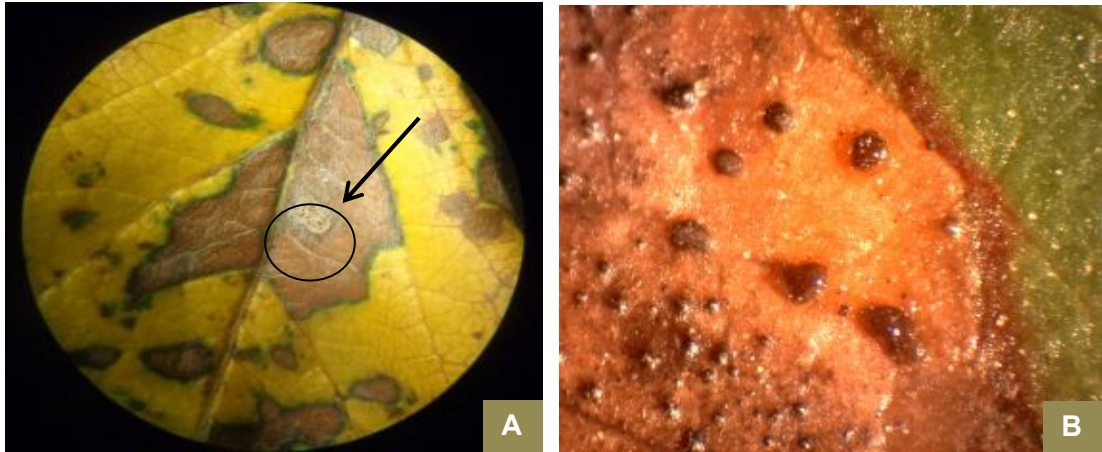
### **4.1. DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS Y SIGNO EN HOJAS Y FRUTOS**

En las visitas al predio se observó consistentemente, tanto en las plantas de la variedad principal Cripp's Pink, como de la polinizadora Brasil Gala, la presencia de síntomas típicos de MFG tanto en hojas como en frutos.

Los síntomas de MFG ocurrieron en forma generalizada en casi la totalidad de las plantas del cuadro muestreado, principalmente en la zona más baja, donde se observó mayor incidencia de la enfermedad, coincidiendo con la zona más húmeda del cuadro. Además se constató amarillamiento de las hojas en la mayoría de las plantas, lo que resultó en una fuerte defoliación prematura de las mismas. Tanto en hojas como en frutos los síntomas fueron observados en las diferentes alturas de las plantas.

Los síntomas observados en hojas consistieron en manchas necróticas de forma irregular y tamaño variable (1-2cm) produciéndose la coalescencia de dos o más manchas. Inicialmente aparecen pequeñas puntuaciones de colores púrpuras, que luego evolucionan aumentando de tamaño y tomando coloraciones que varían de marrón-rojizo a marrón claro en el centro, con bordes definidos de coloración más oscura. Estas manchas se distribuyen de forma aleatoria en el limbo foliar pudiendo coexistir en una misma hoja manchas en distinto estado de desarrollo. Las lesiones más maduras presentaron tonalidades más claras, tornándose marrón- grisáceas en el centro.

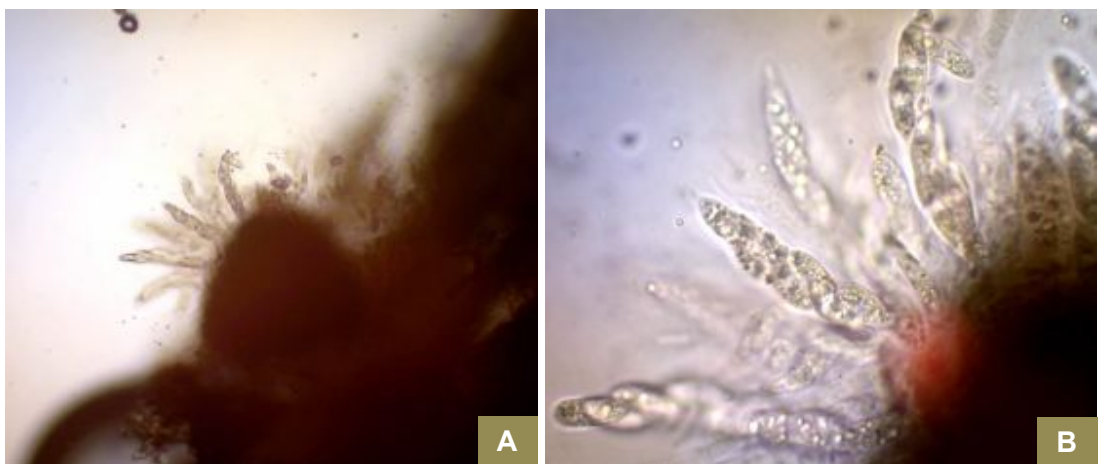
Es en esta zona más clara donde se observaron, tanto a simple vista como bajo lupa, puntuaciones negras que se corresponden con las estructuras fructíferas del hongo. Estas estructuras resultaron ser peritecios o acérvulos conteniendo ascosporas o conidios respectivamente (Figura 5). Cuando se produce la coalescencia entre manchas, las hojas toman coloración amarilla y caen, produciéndose así una defoliación temprana de los árboles.

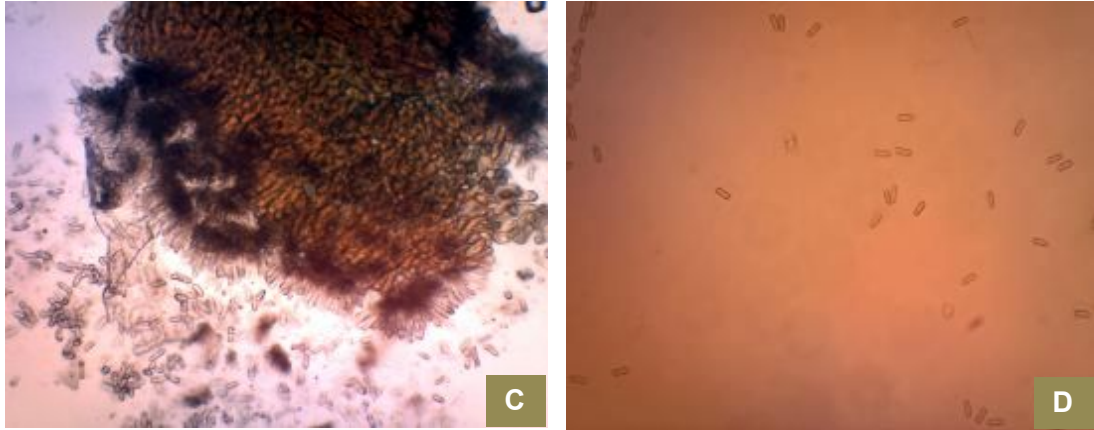


**Mancha foliar necrótica presentando una zona más clara con puntuaciones negras correspondientes a estructuras fructíferas del hongo (A). Observación bajo lupa de las estructuras fructíferas (acérvulos o peritecios) sobre una mancha foliar (B).**

**Figura 5. Síntoma y signo en hoja característico de la MFG.**

Las estructuras presentes sobre las manchas foliares fueron observadas bajo microscopio pudiéndose constatar la presencia de ascas, ubicadas en el interior de los peritecios. Estas ascas tenían formas oblongas o claviformes, engrosadas en el ápice y contienen ocho ascosporas hialinas, unicelulares y fusiformes. También se observó la presencia de acérvulos produciendo conidios, sostenidos por conidióforos. Los conidios resultaron ser hialinos, unicelulares, de forma cilíndrica y predominantemente con sus extremos obtusos (Figura 6).





Peritecio liberando ascosporas (A) y detalle de las ascas conteniendo ocho ascosporas cada una (B). Acérvulo liberando conidios ubicados sobre conidióforos (C) y detalle de los conidios (D).

**Figura 6. Observación al microscopio de las estructuras fructíferas y esporas de *Colletotrichum* spp.**

En los frutos los síntomas observados consistieron en lesiones pequeñas, deprimidas, de 1 a 3 mm de diámetro, rodeadas de halo rojizo. Internamente profundizan 1 a 2 mm en la pulpa. La zona interna afectada tiene aspecto corchoso y de color marrón claro a marrón oscuro. Las lesiones se distribuyen aleatoriamente sobre el fruto y sobre ellas no se encontraron estructuras fructíferas del hongo. Las lesiones no evolucionan en tamaño ni en aspecto, nunca evolucionaron a podredumbre como ocurre con la PA.

#### 4.2 OBTENCIÓN DE LOS AISLADOS

De los aislamientos realizados se obtuvo una colección de 29 aislados monospóricos. De ellos, cuatro fueron aislados de hojas con síntomas y 25 de frutos con síntomas. A estos se sumaron 18 aislados monospóricos obtenidos de hojas con síntomas en la temporada anterior (2014) que se encontraban en la colección del Laboratorio de Fitopatología. Estos 18 aislados fueron obtenidos del mismo monte y utilizando los mismos procedimientos ya descritos (Tabla 2).

### 4.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS

#### 4.3.1. Amplificación por PCR

Todos los aislados fueron amplificados con los cebadores GDF1/GDR1. Los amplicones obtenidos correspondieron a un fragmento de ADN de aproximadamente 250 pb (Figura 7).



Carriles 1 a 5: aislados F80, F81, F82, F83 y F84, carril 6: control negativo y carril 7 marcador de peso molecular.

**Figura 7. Productos amplificados mediante PCR utilizando los cebadores GDF1/ GDR1.**

#### **4.3.2. Análisis filogenéticos**

El alineamiento de las secuencias editadas de la región GAPDH de los 47 aislados obtenidos y las 16 secuencias extraídas del GenBank, se compuso de 206 nucleótidos, de los cuales 115 fueron parsimoniosamente informativos.

El análisis por Máxima Parsimonia resultó en 7 árboles más parsimoniosos y uno de ellos se muestra en la Figura 8.

Los aislados de *Colletotrichum* se agruparon en dos clados mayores, ambos con un soporte de bootstrap del 100 %. Uno de los clados agrupó a la mayoría de los aislados (42 en total) junto con las secuencias de *C. fructicola*, por lo que quedaron identificados como esta especie, mientras que las especies filogenéticamente más cercanas se ubicaron en otros subclados. Todas las especies incluidas en este clado mayor pertenecen al complejo de especies de *C. gloeosporioides*.

El otro clado mayor agrupó a la especie *C. karstii* junto con los restantes cinco aislados en un clado menor lo que los identifica como *C. karstii*, las especies filogenéticamente más cercanas se ubicaron en otros clados menores. En este caso todas las especies incluidas en este clado mayor pertenecen al complejo de especies de *C. boninense*.





Los valores de los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones.

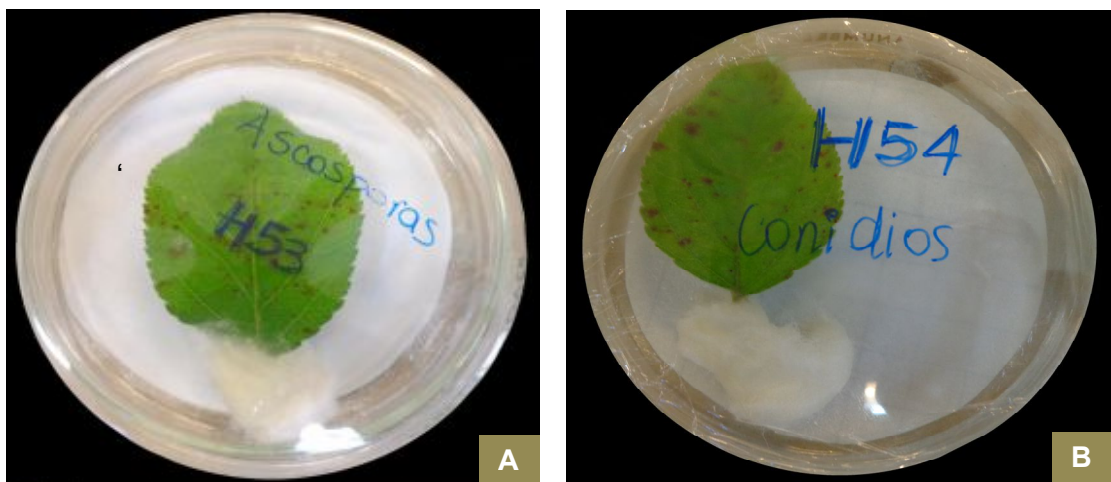
**Figura 8. Uno de los árboles con mayor parsimonia obtenido del análisis de la región GAPDH de todos los aislados obtenidos de manzano y secuencias de especies filogenéticamente cercanas extraídas del GenBank.**

#### **4.4. ENSAYOS DE PATOGENICIDAD**

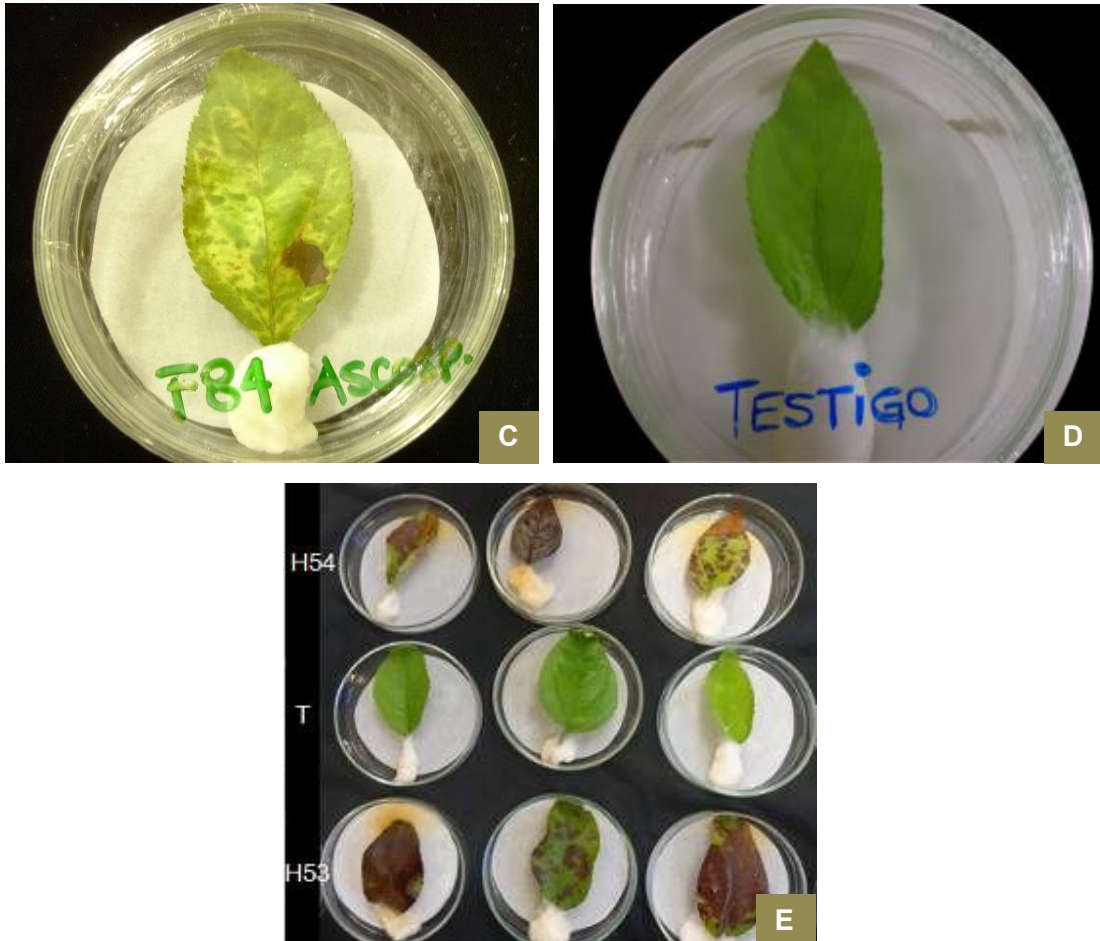
La patogenicidad de los aislados de *C. fructicola* provenientes de hojas y de frutos con síntomas fue comprobada inoculando hojas, brotes y frutos con ascosporas y con conidios. La patogenicidad de *C. karstii* fue comprobada mediante inoculación con conidios sobre brotes y frutos. Inoculando mediante aspersión de conidios y ascosporas fue posible reproducir los síntomas de manchas foliares, defoliación y lesiones en frutos, los tres síntomas asociados a esta enfermedad.

##### **4.4.1. Patogenicidad en hojas desprendidas**

Todas las hojas inoculadas tanto con conidios como con ascosporas manifestaron síntomas de manchas foliares (Figura 9), característicos de la MFG. Para todos los aislados inoculados, que en este caso correspondieron a la especie *C. fructicola*, se observó la aparición de las primeras lesiones necróticas al cabo de 72hs. Las lesiones evolucionaron en el correr de los días, aumentando de tamaño y en algunos casos se observó amarillamiento de la hoja. En las hojas utilizadas como tratamiento testigo no se constataron lesiones de ningún tipo manteniendo el verde original.







Manchas foliares características de MFG en hojas inoculadas con ascosporas (A) y con conidios (B) de aislados de *Colletotrichum fructicola* provenientes de hojas a las 72hs desde la inoculación. Manchas foliares características de MFG en hojas inoculadas con ascosporas (C) de aislado de *Colletotrichum fructicola* proveniente de fruto a las 72hs desde la inoculación Testigo sin presencia de síntomas (D). Síntomas foliares al cabo de 8 días desde la inoculación (E).

Figura 9. Patogenicidad en hojas desprendidas.

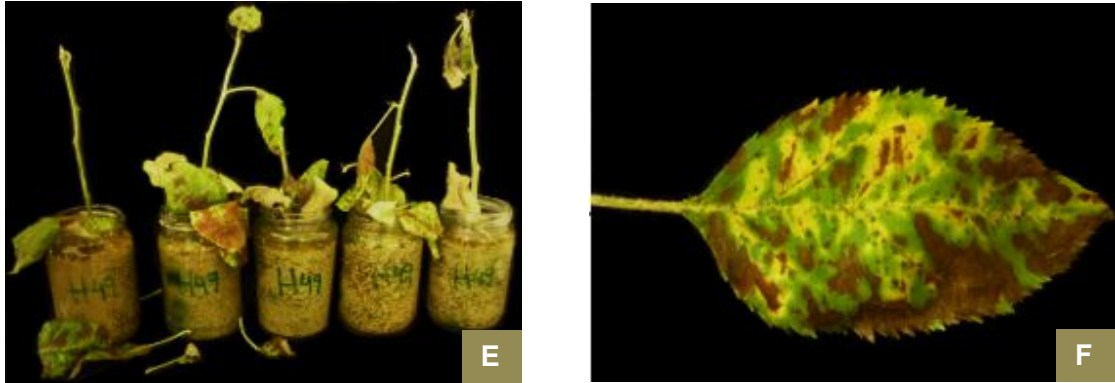
#### 4.4.2. Patogenicidad en brotes jóvenes

Todos los brotes inoculados con ascosporas de los aislados de *C. fructicola* presentaron síntomas típicos de la MFG. Al igual que lo que sucedió cuando se inocularon hojas desprendidas, los síntomas en las hojas aparecieron al tercer día después de la inoculación e inicialmente consistieron

en pequeñas manchas que luego evolucionaron en tamaño con el correr de los días. Las hojas afectadas manifestaron amarillamiento y posteriormente los brotes se defoliaron al cabo de 8 a 10 días, cayendo entre un 80 a 90% de las hojas. Los brotes inoculados con ADE mantuvieron su aspecto verde normal, sin manifestar ningún síntoma.

Los brotes inoculados con conidios de *C. karstii* tardaron más tiempo en manifestar síntomas y estos fueron menos severos que los ocasionados por *C. fructicola*. Las primeras manchas se observaron recién a los 7 días después de la inoculación afectando una o dos hojas del brote, y al cabo de los 10 días la defoliación era muy leve, cayéndose sólo el 20 a 30% de las hojas (Figura 10).





**Manchas foliares características de MFG en brotes jóvenes inoculados con ascosporas de *C. fructicola* del aislado H49 (A) y comparación de sintomatología entre un brote inoculado con este aislado y un brote testigo (B). Manchas foliares características de MFG en brotes jóvenes inoculados con conidios de *C. karstii* del aislado H51 (C). Detalle de los síntomas foliares desarrollados en brotes inoculados (D). Fuerte defoliación de los brotes inoculados al cabo de 8 a 10 días (E) y detalle de los síntomas foliares de las hojas de los brotes defoliados (F).**

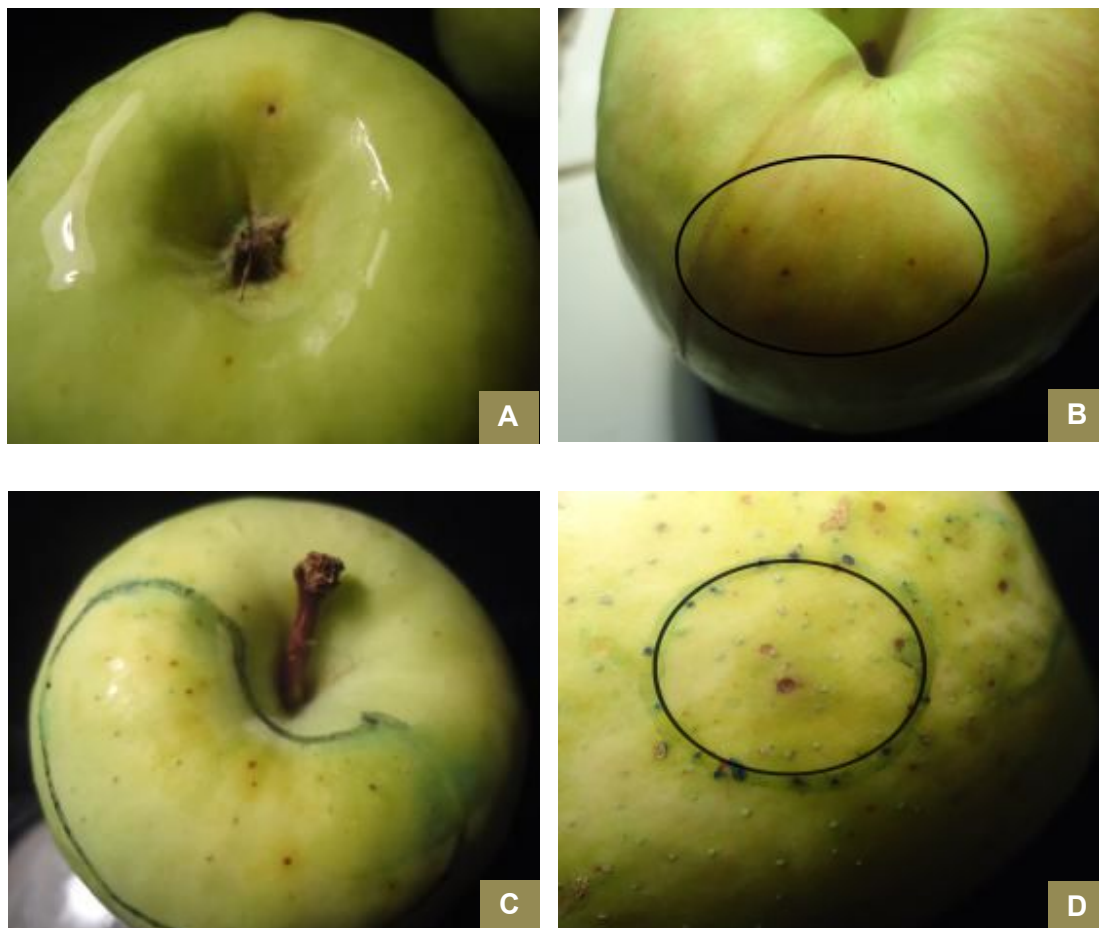
**Figura 10. Patogenicidad en brotes jóvenes.**

#### **4.4.3. Patogenicidad en frutos**

Los frutos inoculados con aislados de *C. fructicola* provenientes de hojas y frutos afectados, manifestaron lesiones típicas de MFG inoculando tanto con ascosporas como con conidios. Los frutos inoculados con conidios de *C. karstii* proveniente de hojas también manifestaron los síntomas típicos de MFG. Si bien no todas las repeticiones presentaron síntomas, al menos en tres de las cinco, se observaron las manchas típicas de MFG y en ambas especies.

En todos los casos, los síntomas comenzaron a visualizarse al cabo de 20 días desde la inoculación. Inicialmente aparecieron pequeñas manchas (2-3 mm de diámetro), circulares, deprimidas, de aspecto corchoso y coloración marrón claro. Estas manchas no aumentaron de tamaño ni profundizaron más de 2 mm hacia el interior del fruto, tampoco evolucionaron a podredumbre durante un período de 45 días en los que fueron periódicamente observados (Figura 11).

Los frutos utilizados como testigo e inoculados con ADE, no desarrollaron síntomas de MFG durante el transcurso del ensayo.



Lesiones necróticas, pequeñas y circulares características de MFG en frutos inoculados con *C. fructicola* y *C. karstii* (A, B y C), detalles de las lesiones (D).

### Figura 11. Patogenicidad en frutos.

De las lesiones desarrolladas en los frutos inoculados fue posible re-aislar al patógeno (Figura 12). Las colonias aisladas a partir de síntomas de los frutos inoculados presentaban características (aspecto de colonia, tipo de esporas) similares a las colonias de *Colletotrichum* spp. que fueron inoculadas, completándose de esta manera los postulados de Koch.

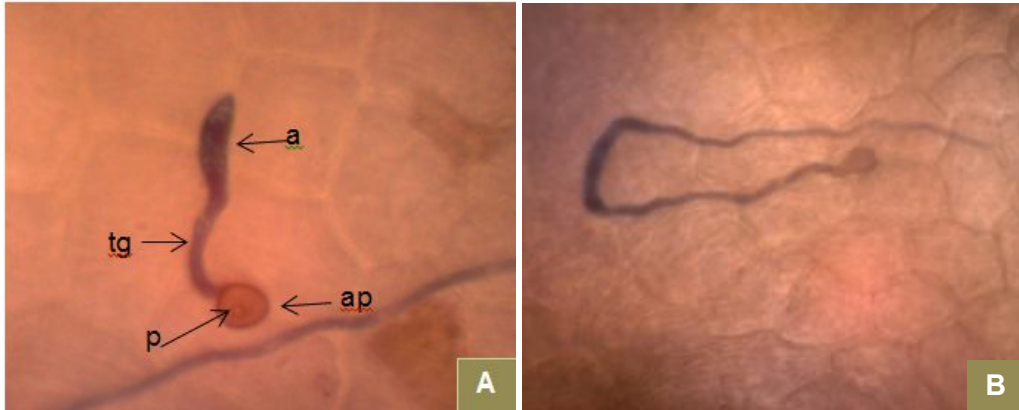




**Figura 12. Crecimiento de los aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos mediante el re-aislamiento del patógeno a partir de las lesiones en frutos.**

#### **4.5 DESCRIPCIÓN DE LAS PRIMERAS ETAPAS DEL PROCESO INFECCIOSO EN HOJAS**

Mediante la metodología de Stadnik y Buchenauer (2000) fue posible comprobar la germinación de las ascosporas sobre las hojas inoculadas, al cabo de 48 hs desde la inoculación. Las ascosporas germinaron formando entre uno y dos tubos germinativos de longitud variable y ubicados en todos los casos en el extremo polar de la espora (Figura 13). En el extremo de los tubos germinativos se formaron apresorios, de coloración oscura (melanizados) y forma ovalada. Los apresorios presentaron poro.



Germinación de ascosporas (A y B). Ascospora germinada (a) formando tubos germinativos (tg) y apresorios (ap) con poro (p) sobre el tejido foliar.

**Figura 13. Visualización del proceso de germinación de ascosporas en el tejido foliar.**

## 5. DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis permitió confirmar la presencia en Uruguay, de la enfermedad conocida como Mancha Foliar por *Glomerella* en un monte comercial de manzano de las variedades Cripp's Pink y Brasil Gala ubicado en la zona de Kiyú, departamento de San José.

Los síntomas en hojas y frutos observados en dicho monte, coincidieron con la sintomatología de la MFG descrita en la bibliografía (Sutton y Sanhueza 1998, Sanhueza et al. 2002, Wang et al. 2012, Hamada 2013). En los frutos, los síntomas de MFG consistieron en pequeñas lesiones circulares, deprimidas, de color marrón claro a oscuro rodeadas de halo rojizo. Estas no profundizan más de 2mm en la pulpa, tienen consistencia corchosa, no aumentan en tamaño ni evolucionan a podredumbre. En ningún caso se pudo observar la reproducción del hongo sobre las lesiones en frutos. Sin embargo se pudo constatar que el patógeno, aunque queda restringido en la zona de infección, permanece viable en esas lesiones ya que fue posible aislarlo. La ausencia de referencia indica que sería esta la primera vez que se aíslan cepas de *Colletotrichum* causantes de la MFG a partir de lesiones en frutos.

Sobre la planta se pudo observar la presencia de manchas foliares, amarillamiento y defoliación prematura de los árboles afectados. Sobre las manchas foliares se constató la presencia de acérvulos y de peritecios. La producción de esporas sexuales (ascosporas) en peritecios durante el verano le permite al patógeno dispersarse por corrientes de aire. Esto explica la presencia de síntomas en las partes más altas de las plantas que no podrían ser alcanzadas por conidos salpicados por agua de lluvia. Esto es una diferencia importante en comparación con las poblaciones de *Colletotrichum* causantes de la PA que solo se dispersan por salpicado del agua de lluvia (Alaniz et al., 2015). Los síntomas de MFG se encuentran dispersos en forma generalizada en el monte y en las plantas, mientras que los síntomas de PA tienen una distribución agregada.

El rol de las ascosporas de *C. fructicola* como inóculo secundario quedó demostrado al inocular hojas, brotes y frutos y reproducir los síntomas de MFG en todos los órganos inoculados. Hasta lo que sabemos es la primera vez que se logran reproducir los síntomas de MFG utilizando ascosporas como inóculo. La observación de las ascosporas de *C. fructicola* germinando sobre la hoja mostró que estas emiten uno o dos tubos germinativos y forman apresorios ovales, similares a los formados por la germinación de conidios (Velho et al., 2015). Las ascosporas al germinar en tan sólo 48hs demuestran el corto

período de incubación de esta enfermedad, correspondiéndose con la aparición de los primeros síntomas a las 72hs desde la inoculación, según los resultados de las pruebas de patogenicidad realizadas.

No fue posible encontrar ascosporas de *C. karstii* ni producirlas en placa, por lo que esta especie de *Colletotrichum* a pesar de tener la capacidad de producir la MFG, su comportamiento es diferente. Los aislados de *C. karstii* solo produjeron conidios en placas, y al ser inoculados mostraron menor agresividad (demoró más la aparición de los síntomas y estos fueron menos severos) en comparación con los aislados de *C. fructicola*. Esta menor agresividad de *C. karstii* puede ser la explicación de por qué apareció en menor proporción en la población de aislados (10,6 % de los aislados).

En el monte afectado fue posible encontrar simultáneamente la presencia de podredumbre amarga con su distribución agregada característica y Mancha foliar por *Glomerella* distribuida en forma generalizada, por lo que allí coexisten ambas enfermedades. Las poblaciones de *C. fructicola* responsables de ocasionar la MFG se han diferenciado de las poblaciones causantes de la PA. Por un lado han adquirido la habilidad de infectar hojas produciendo manchas foliares sobre las que se reproducen tanto sexual como asexualmente y por otro, han perdido la capacidad de ocasionar podredumbres de frutos. Esta adaptación también habría ocurrido en las poblaciones de *C. karstii*, como lo reportado por Velho et al. (2015) en Brasil, quienes observaron producción de peritecios en aislados de esta especie; sin embargo en nuestro país no se pudo constatar la reproducción sexual de *C. Karstii*.

El análisis molecular de la región GAPDH fue útil para determinar la identidad de todos los aislados (Damm et al. 2012b, Weir et al. 2012). Sin embargo, el valor de soporte de los nodos de los subclados que agrupan a ambas especies, fue inferior a 70. Según el criterio de Hillis y Bull (1993) valores de soportes de nodos superiores a 70 son necesarios para identificar con certeza a las especies. La incorporación de nuevos genes al análisis filogenético como Beta tubulina (TUB2) (Alaniz et al., 2015), Actina o Calmodulina (Cannon et al., 2012), podría incrementar el valor del soporte de los nodos y por tanto la confiabilidad en la identificación de las especies.

La especie *C. fructicola* fue la predominante (42 aislados) y la segunda especie fue *C. karstii* (5 aislados). Ambas especies identificadas en nuestro país coinciden con las ya reportadas en Brasil como causantes de la MFG (Velho et al. 2014, Velho et al. 2015, Rockenbach et al. 2016), mientras que en China solo se ha reportado *C. fructicola* (Wang et al., 2012), siendo en todos los casos esta última la especie predominante. Ambas especies habían sido reportadas ocasionando la PA en Uruguay (Alaniz et al., 2015). Esto demuestra que el



fenómeno que provoca que ciertas poblaciones de *Colletotrichum* dejen de producir la PA para ocasionar la MFG ocurre en más de una especie de este género.

No se conocen las razones por las que en este predio ha emergido una enfermedad nueva ocasionada por las mismas especies de *Colletotrichum* que causan la PA. Las dos explicaciones posibles son que las poblaciones causantes de la MFG hayan derivado de las poblaciones que causan la PA o que hayan sido introducidas de otro lugar donde está presente la enfermedad. En este caso la posibilidad más cercana sería una introducción desde Brasil, ya que allí se ha constatado la presencia de ambas especies causando MFG (Rockenbach et al., 2016).

Tampoco hemos encontrado una explicación de por qué la enfermedad hasta el momento solo se encuentra presente en ese lugar. Se trata de un monte de las variedades Gala y Cripp's Pink, ambas susceptibles a la MFG y su ubicación en una zona baja y húmeda podría estar dando condiciones favorables al desarrollo de esta nueva enfermedad en Uruguay.

## **6. CONCLUSIONES**

Se confirmó que la enfermedad MFG se encuentra instalada en el predio donde previamente fue registrada su presencia por primera vez en Uruguay.

Existen al menos dos especies de *Colletotrichum* causando MFG en Uruguay, *C. fructicola* y *C. karstii*. *C. fructicola* es la especie predominante y más agresiva mientras que *C. karstii* aparece en menor proporción y se comporta con menor agresividad.

Tanto las ascosporas como los conidios de *C. fructicola* son capaces de producir los síntomas típicos de MFG en hojas y frutos.

En el caso de *C. karstii* solo se observó la producción de conidios. Los conidios producidos por esta especie también son capaces de generar los síntomas típicos de MFG en hojas y frutos.

Las ascosporas de *C. fructicola* cumplen un rol fundamental en el desarrollo y dispersión de la MFG, causando una distribución generalizada de los síntomas dentro del árbol y en el monte.

Las variantes de *Colletotrichum* spp. capaces de ocasionar la MFG ven limitado su desarrollo en los frutos, a pesar de mantenerse viables, su efecto se limita a pequeñas lesiones sobre las cuales no logra reproducirse. En cambio estas cepas tienen la capacidad de producir lesiones en hojas sobre las cuales producen inóculo secundario (conidios y/o ascosporas).

## **7. RESUMEN**

El manzano, tanto en Uruguay como en el mundo, es el frutal de hoja caduca de mayor importancia económica. Las principales enfermedades que afectan este cultivo son la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*) y la podredumbre amarga (*Colletotrichum* spp.). Recientemente se ha constatado la presencia de una nueva enfermedad en nuestro país, denominada Mancha Foliar por Glomerella causada por poblaciones de hongos del género *Colletotrichum*. Este trabajo procuró profundizar en el conocimiento de esta enfermedad. Se realizó una descripción detallada de los síntomas y signos, y se obtuvieron aislados monospóricos a partir de hojas y frutos con síntomas. Se realizaron inoculaciones cruzadas (hojas y frutos) utilizando ascosporas o conidios, reproduciéndose los síntomas de MFG tanto en hoja como en fruta. La colección de aislados se identificó mediante análisis de la región génica GAPDH. Según los resultados del análisis filogenético, la especie predominante en Uruguay es *C. fructicola*, seguida por *C. karstii* en menor proporción. Todos los aislados de *C. fructicola* y el de *C. karstii* inoculados en hojas desprendidas, brotes y frutos lograron reproducir los síntomas característicos de la Mancha Foliar por Glomerella. La mayoría de los aislados de *C. fructicola* produjeron ascosporas mientras que los de *C. karstii* solo produjeron conidios. Hasta lo que pudimos saber es la primera vez que se reproducen los síntomas de MFG inoculando con ascosporas de *C. fructicola*.

Palabras clave: Manzano; Mancha Foliar por Glomerella; Patogenicidad; Ascosporas; Conidios; *Colletotrichum fructicola*; *Colletotrichum karstii*.

## 8. SUMMARY

The Apple, both in Uruguay as in the world, is the fruit of deciduous tree of greater economic importance. The main diseases that affect this crop are apple scab (*Venturia inaequalis*) and bitter rot (*Colletotrichum* spp.). Recently is has found the presence of a new disease in our country, so-called Glomerella Leaf Spot (GLS) caused by populations of fungi of the genus *Colletotrichum*. This work aimed to deepen in the knowledge of this disease. It was a detailed description of the symptoms and signs, and isolates monosporic from leaves and fruit with symptoms were obtained. Is carried out cross inoculations (leaves and fruit) using ascospores or conidia, is reproduced the symptoms of MFG both in leaf as in fruit. The collection of isolates is identified through analysis of the region gene GAPDH. According to the results of the phylogenetic analysis, the species predominantly in Uruguay are *C. fructicola*, followed by *C. karstii* in lower proportion. All those isolated of *C. fructicola* and the of *C. karstii* inoculated in detached leaves, shoots and fruits were able to reproduce the characteristic symptoms of Glomerella Leaf Spot. The majority of them isolated of *C. fructicola* produced ascospores while those of *C. karstii* only produced conidia. Until what could know is the first time that will reproduce the symptoms of GLS by inoculating with ascospores of *C. fructicola*.

Keywords: Apple; Glomerella Leaf Spot; Pathogenicity; Ascospores; Conidia; *Colletotrichum fructicola*; *Colletotrichum karstii*.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Alaniz, S.; Hernández, L.; Damasco, D.; Mondino, P. 2012. First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae* causing bitter rot on apple in Uruguay. *Plant Disease*. 96: 3: 458.
2. \_\_\_\_\_.; Leoni, C.; Bentancour, O.; Mondino, P. 2014. Suppression of summer fungicide sprays for apple scab (*Venturia inaequalis*) management in Uruguay. *Scientia Horticulturae*. 165 :331-335.
3. \_\_\_\_\_.; Hernández, L.; Mondino, P. 2015. *Colletotrichum fructicola* is the predominant and one of the most aggressive species causing apple bitter rot in Uruguay. *Tropical Plant Pathology*. 40 (4): 265-274.
4. Becker, W. F.; Katsurayama, Y.; Boneti, J. I. S. 2000. Mancha foliar da gala; principal doença de verão da cultura da macieira. *Agropecuária Catarinense*. no.13: 14-20.
5. Bonetti, J. I. S.; Katsurayama, Y. 1999. Epidemiologia da mancha foliar de gala. In: *Reunião Anual de Fitossanidade na Cultura da Macieira (4ª., 1999, Florianópolis)*. Anais. Florianópolis, BR, EPAGRI. pp. 5-8.
6. Cai, L.; Hyde, K. D.; Taylor, P. W. J.; Weir, B. S.; Waller, J.; Abang, M. M.; Zhang, J. Z.; Yang, Y. L.; Phoulivong, S.; Liu, Z. Y.; Prihastuti, H.; Shivas, R. G.; McKenzie E. H. C.; Johnston, P. R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*. 39: 183-204.
7. Cannon, P. F.; Damm, U.; Johnston, P. R.; Weir, B. S. 2012. *Colletotrichum* current status and future directions. *Studies in Micology*. 73: 181-213.
8. Casanova, L. 2015. Diversidad, sobrevivencia y manejo de *Colletotrichum spp.* en manzano. Tesis Magister en Ciencias Agrarias opción Ciencias Vegetales. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 71 p.
9. Cheon, W.; Lee, S. G.; Jeon, Y. 2016. First Report on Fruit Spot Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Apple (*Malus pumila* Mill.) in Korea. *Plant Disease*. 100 (1): 210.

10. Crusius, L. U.; Forcelini, C. A.; Sanhueza, R. M. V; Fernandes, J. M. C. 2002. Epidemiology of apple leaf spot. *Fitopatologia Brasileira*. 27: 65-70.
11. Damasco, D. 2011. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. Acutatum* y *C. Fragariae* causantes de la podredumbre amarga en manzano. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 53 p.
12. Damm, U.; Cannon, P. F.; Woudenberg, J. H. C.; Crous, P. W. 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*. 73:(1) 37-113.
13. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; Johnston, P. R.; Weir, B. S.; Tan, Y. P.; Shivas, R. G.; Crous, P. W. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*. 73:(1) 1-36.
14. Denardi, F.; Berton, O.; Spengler, M. M. 2003. Resistência genética a podridão amarga em maçãs, determinadas pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos. *Revista Brasileira de Fruticultura (Jaboticabal)*. 25:494-497.
15. Du, X. L.; Cao K. Q.; Hu, T. L.; Liu, Y. J.; Wang, S. T.; Wang, Y. N. 2015. First report of *Glomerella cingulata* causing glomerella leaf spot on pear in Hebei, China. *Plant Disease*. 99:4:553.
16. FAO. 2016. FAOSTAT. (en línea). Roma. s.p. Consultado ago. 2016. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
17. Freeman, S.; Minz, D.; Jurkevitch, E.; Maymon, M.; Shabi, E. 2000. Molecular analysis of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Biochemistry and Cell Biology*. 90:608-614.
18. Fukaya, M. 2004. First report of Japanese pear anthracnose disease caused by *Colletotrichum acutatum* and its chemical control. *Japanese Journal of Phytopathology*. 70: 184-189.

19. González, E.; Sutton, T. B. 1999. First report of glomerella leaf spot (*Glomerella cingulata*) of apple in the United States. *Plant Disease*. 83: 1074.
20. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 2005. Differentiation of isolates of *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum* spp. associated with glomerella leaf spot and bitter rot of apples using growth rate, response to temperature, and benomyl sensitivity. (en línea). *Plant Health Progress*. 2005: s.p. Consultado set. 2016. Disponible en <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2005/apple/>
21. Hamada, N. A. 2013. Epidemiologia da mancha foliar de glomerella em macieira. Tesis Doctorado. Curitiba, PR, Brasil. Universidade Federal do Paraná. 117 p.
22. Hillis, D.; Bull, J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*. 42:182-192.
23. Illinois IPM (Illinois University. Integrated Pest Management Program, US). 2005. Report on plant disease; bitter rot of apple. (en línea). Champaign, IL. 3 p. (RPD no. 818). Consultado 4 jun. 2015. Disponible en <https://ipm.illinois.edu/diseases/rpds/818.pdf>
24. Larkin, M.; Blackshields, G.; Brown, N.; Chenna, R.; McGettigan, P.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.; Wilm, A.; López, R.; Thompson, J.; Gibson, T.; Higgings, D. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947-2948.
25. Leite, R. P.; Tsuneta, M.; Kishino, A. Y. 1988. Ocorrência de mancha foliar de glomerella em macieira no estado do Paraná. Fundação Instituto Agrônomo do Paraná. Informe de Pesquisa no. 81. s.p.
26. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2012. Encuesta frutícola; zafra 2011-2012. (en línea). Montevideo. 28 p. (Serie Encuestas no. 308). Consultado jul. 2016. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-ipr-produccion-vegetal-fruticultura,O.es,0>

27. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2015. Encuesta frutícola; zafra 2013-2014. (en línea). Montevideo. 25 p. (Serie Encuestas no. 326). Consultado jul. 2016. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2.diea,diea-ipr-produccion-vegetal-fruticultura,O,es,0>
28. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2016. Encuesta frutícola; zafra 2014-2015. (en línea). Montevideo. 27 p. (Serie Encuestas no. 332). Consultado jul. 2016. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2.diea,diea-ipr-produccion-vegetal-fruticultura,O,es,0>
29. Mondino, P. 2005. Sistema de Soporte a la Decisión (SSD) para la protección integrada del manzano. Tesis PhD. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. 258 p.
30. \_\_\_\_\_.; Alaniz, S. 2009a. Manejo integrado de la sarna del manzano ocasionada por *Venturia inaequalis*. In: Stadnik, M. ed. Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis, CCA/UFSC. pp. 35-43.
31. \_\_\_\_\_.; Di Masi, S.; Falconí, C.; Montealegre, J.; Henríquez, J. L.; Nunes, C.; Salazar, M.; Stadnik, M.; Vero, S.; Usall, J. 2009b. Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha. Montevideo, Facultad de Agronomía. 67 p.
32. Palocci, F.; Rubini, A.; Granetti, B.; Arcioni, S. 1999. Rapid molecular approach for reliable identification of *Tuber spp.* ectomycorrhizae. FEMS Microbiology Ecology. 28: 23-30.
33. Phoulivong, P.; Cai, L.; Chen, H.; McKenzie, H. H. C.; Abdelsalam K.; Chukeatirote, E.; Hyde, K. D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. Fungal Divers. 44: 33-43.
34. Phoulivong, S.; McKenzie E. H. C.; Hyde, K. D. 2012. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. Current Research in Environmental and Applied Mycology. 2: 99-111.
35. Rockenbach, M. F.; Velho, A. C.; Gonçalves, A. E.; Mondino, P.; Alaniz, S.; Stadnik, M. J. 2016. Genetic structure of *Colletotrichum fruticola*



species associated to apple bitter rot and glomerella leaf spot in Southern Brazil and Uruguay. *Phytopathology*. 106: 7: 771-774.

36. Sanhueza, R. M. V.; Becker, W.; Boneti, J. I. S.; Katsurayama, Y.; Czermainski, A. B. C. 2002. Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã. Bento Gonçalves, RS, EMBRAPA. 12 p. (Circular técnica no. 36).
37. Schubert, T. S. 1983. Bitter rot of apple. *Plant Pathology Circular*. no. 248: 2.
38. Stadnik, M. J.; Buchenauer, H. 2000. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57: 25-34.
39. Sutton, T. B. 1990. Bitter rot. In: Jones, A. L.; Aldwinckle, H. S. eds. *Compendium of apple and pear diseases*. St. Paul, MN, APS. pp. 15-16.
40. \_\_\_\_\_.; Sanhueza, R. M. V. 1998. Necrotic leaf blotch of Golden delicious – glomerella leaf spot a resolution of common names. *Plant Disease*. 82: 267-268.
41. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5; molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*. 28: 2731-2739.
42. Taylor, J. 1971. A Necrotic Leaf Blotch and fruit rot of apple caused by a strain of *Glomerella cingulata*. *Phytopathology*. 61: 221-224.
43. Valero, M.; García-Martínez, S.; Giner, M.; Alonso, A.; Ruiz, J. 2010. Benomyl sensitivity assays and species – specific PCR reactions highlight association of two *Colletotrichum gloeosporioides* types and *C. acutatum* with rumple disease on Primofiori lemons. *European Journal of Plant Pathology*. 127: 399-405.
44. Velho, A. C.; Stadnik, M. J.; Casanova, L.; Mondino, P.; Alaniz, S. 2014a. First Report of *Colletotrichum karstii* causing Glomerella leaf spot on apple in Santa Catarina state Brazil. *Plant Disease*. 98 (1): 157.

45. \_\_\_\_\_.; Casanova, L.; Mondino, P.; Alaniz, S.; Stadnik, M. J. 2014b. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing apple Bitter rot in southern Brazil. *Plant Disease*. 98 (4): 567.
46. \_\_\_\_\_.; Alaniz, S.; Casanova, L.; Mondino, P.; Stadnik, M. J. 2015. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. *Fungal Biology*. 119: 229-244.
47. \_\_\_\_\_.; Rockenbach, M. F.; Mondino, P.; Stadnik, M. J. 2016. Modulation of oxidative responses by a virulent isolate of *Colletotrichum fructicola* in apple leaves. *Fungal Biology*. 120 (10): 1184-93.
48. Wang, C. X.; Zhang, Z. F.; Li, B. H. 2012. First report of glomerella leaf spot of apple caused by *Glomerella cingulata* in China. *Plant Disease*. 96 (6): 912.
49. Wang, W.; Fu, D. D.; Zhang, R.; Sun, G. Y. 2015. Etiology of apple leaf spot caused by *Colletotrichum* spp. *Mycosystema*. 34 (1): 13–25.
50. Weir, B.; Johnston, P. R.; Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gbeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*. 73 (1): 115–180.
51. Wharton, P. S.; Diéguez-Urbeondo, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 61: 3-22.
52. Zhang, P. F.; Zhai, L. F.; Zhang, X. K.; Huang, X. Z.; Hong, N.; Xu, W; Wang, G. 2015. Characterization of *Colletotrichum fructicola*, a new causal agent of leaf black spot disease of sandy pear (*Pyrus pyrifolia*). *European Journal of Plant Pathology*. 143 (4): 651-662.