

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

Phomopsis spp. Y OTROS HONGOS ASOCIADOS A LA
MUERTE DE RAMAS PRODUCTIVAS EN DURAZNEROS
Y NECTARINOS EN EL SUR DEL URUGUAY

por

María Inés ALVAREZ NODA
Elsa María PERDOMO FERRANDO

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
2015

Tesis aprobada por:

Director: -----

Dra. Ing. Agr. Sandra María Alaniz Ferro

Dr. Ing. Agr. Pedro Emilio Mondino Hintz

Dra. Ing. Agr. Ana Elisa Silvera Pérez

Fecha: 30 de diciembre de 2015

Autores: -----

María Inés Alvarez Noda

Elsa María Perdomo Ferrando

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias, por el apoyo incondicional brindado durante los años de estudio en esta apreciada casa de estudio.

A nuestros amigos y compañeros de vida, por acompañarnos a lo largo de la carrera.

A Erica Martínez, por ser integrante activa del proyecto que dio paso al presente trabajo.

A los productores que nos permitieron el ingreso y la obtención de muestras para la realización del trabajo.

A los integrantes del grupo de trabajo de la Cátedra de Fitopatología, por su dedicación y su disponibilidad de ayudarnos.

A nuestros tutores: Sandra Alaniz y Pedro Mondino, por sus conocimientos, paciencia y tiempo brindados.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE FIGURAS E ILUSTRACIONES.....	V
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 <u>OBJETIVOS</u>	2
1.1.1 <u>Objetivo general</u>	2
1.1.2 <u>Objetivos específicos</u>	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 <u>LOS CULTIVOS DE DURAZNERO Y NECTARINO EN URUGUAY</u>	3
2.2 <u>LA VIRUELA DE LA PÚA</u>	7
2.2.1 <u>Síntomas y signo</u>	8
2.2.2 <u>Agente causal</u>	8
2.2.3 <u>Ciclo de la enfermedad</u>	8
2.2.4 <u>Epidemiología</u>	9
2.3 <u>IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Phomopsis</i></u>	11
2.3.1 <u>Identificación mediante características morfológicas</u>	11
2.3.2 <u>Identificación mediante características moleculares</u>	11
2.4 <u>MANEJO DE VIRUELA DE LA PÚA</u>	12
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	14
3.1 <u>OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS EN CAMPO Y COLECTA DE MUESTRAS</u>	14
3.2 <u>OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS</u>	14
3.3 <u>IDENTIFICACIÓN MOLECULAR</u>	15
3.3.1 <u>Extracción de ADN</u>	15
3.3.2 <u>Amplificación por PCR y secuenciación</u>	16
3.3.3 <u>Análisis filogenético</u>	17
4. <u>RESULTADOS</u>	18
4.1 <u>OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS EN EL CAMPO</u>	18
4.2 <u>OBTENCIÓN DE MONOSPÓRICOS</u>	21
4.3 <u>IDENTIFICACIÓN MOLECULAR</u>	24
5. <u>DISCUSIÓN</u>	27
6. <u>CONCLUSIONES</u>	30
7. <u>RESUMEN</u>	31
8. <u>SUMMARY</u>	32
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	33

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRACIONES

Figura No.	Página
1. Ciclo de la viruela de la Púa causado por <i>Phomopsis</i> sp. en duraznero y nectarino.....	10
2. Diferentes grados de avance del síntoma de hoja bandera: hojas en El proceso inicial de deshidratación(A), hojas enrolladas y deshidratadas(B), hojas necróticas (C), rama muerta sin hojas(D).....	19
3. Detalle de la yema no brotada rodeada de cancro blanquecino (A) y presencia de picnidios de color negro sobre el cancro (B).....	19
4. Estructuras y colonias obtenidas a partir de las muestras sometidas a cámara húmeda. Cirros blanquecinos, alfa conidios (flecha continua), beta conidios (flecha punteada) y colonias típicos del género <i>Phomopsis</i> (A, C, E), cirros anaranjados, conidios provenientes de los cirros anaranjados y colonias de color verde oliva a negro (B, D, F).....	20
5. Productos amplificados mediante PCR utilizando los cebadores ITS1/ITS4. Carril 1: control negativo, carriles 2 a 6: aislados P 34, P35, P36, P37, P38, y carril 7 marcador de peso molecular.....	24
6. Árbol con mayor parsimonia obtenido del análisis de la región ITS de todos los aislados uruguayos obtenidos de durazneros y nectarinos y secuencias de especies similares o filogenéticamente cercanas obtenidas del GenBank. Los valores de los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones, sd.: sin dato.....	26
 Tabla No.	
1. Superficie total plantada y en producción, plantas totales y en producción, producción total y productividad según variedades de duraznero, agrupadas por época de maduración.....	4

2. Superficie total plantada y en producción, plantas en producción, producción total y productividad según variedades de nectarino, agrupadas por época de maduración.....	6
3. Secuencias obtenidas del GenBank utilizadas en el análisis filogenético.....	17
4. Aislados monospóricos obtenidos de las muestras colectadas con síntomas de viruela de la púa y otros síntomas, colectadas de plantaciones comerciales de durazneros y nectarinos ubicados en el sur del Uruguay.....	22

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de duraznero ocupa el primer lugar en importancia social dentro de la fruticultura de hoja caduca en Uruguay. De un total de 929 productores de frutales, 600 cultivan duraznos. A su vez, el duraznero se ubica en segundo lugar (después del manzano) en cuanto a su importancia productiva. En nuestro país hay plantadas 1664 hectáreas de durazneros, que en su conjunto producen alrededor de 17.000 Megagramos (Mg) de fruta por año. Los nectarinos ocupan 174 hectáreas produciendo 1800 Mg. de fruta por año (MGAP. DIEA, 2014). La mayor parte de la producción se destina al consumo interno, mayoritariamente como fruta fresca y el resto a la industria para la elaboración de dulces, conservas o jugos, o a la exportación.

Según datos recabados por MGAP. DIEA (2013) la producción está concentrada en los departamentos de la región sur del país (Montevideo, Canelones, San José y Colonia). A su vez, existe en el Norte un área importante de instalación más reciente que aporta el 8% de la producción.

Las variedades de duraznero se clasifican, según su fecha de cosecha, en muy tempranas (22% del área total), tempranas (33%), de estación (31%) y tardías (14%). En tanto, las variedades de nectarino se dividen en tempranas (20% del área total), de estación (47%) y otras (33%) (MGAP. DIEA, 2015). Es una práctica común entre los productores frutícolas, el cultivar diferentes variedades de durazneros y nectarinos con el objetivo de escalonar los momentos de cosecha. De este modo se amplía el periodo de cosecha extendiendo así la oferta y evitando además la concentración de tareas en un corto período (MGAP. DIEA, 2013).

Actualmente una de las principales limitantes sanitarias de los cultivos de duraznero y nectarino es la muerte de ramas productivas. La principal causa de la muerte de estas ramas, es la ocurrencia de la enfermedad conocida como “viruela de la púa” que es causada por hongos del género *Phomopsis*. Tradicionalmente, esta enfermedad se asociaba a montes viejos, abandonados o estresados por diversos factores. Sin embargo, en los últimos años, se ha convertido en uno de los principales problemas sanitarios en el duraznero y nectarino, ya que aparece en forma generalizada, incluso en montes jóvenes y con buen estado aparente. Su importancia radica en que afecta las ramas productivas provocando su muerte. La muerte de estas ramas implica no solo la disminución de frutos cosechados en la temporada, sino también provoca el debilitamiento de los árboles para temporadas futuras.

En Uruguay, aún no se ha realizado un estudio exhaustivo en procura de determinar la etiología de la muerte de ramas productivas que afecta en forma generalizada a los cultivos de durazneros y nectarinos. En 1981 publicaciones del entonces MAP citaban a *Fusicoccum amygdali* (sinónimo de *Phomopsis amygdali*) como causante de esta enfermedad (MAP. DGSA, 1981). El conocer cuáles son las especies que causan la viruela de la púa, es un primer paso indispensable si se pretende evaluar medidas de manejo como por ejemplo, determinar la efectividad de diferentes fungicidas.

En este trabajo se propuso realizar una prospección en montes de duraznero y nectarinos en la zona sur del país (Montevideo y Canelones). Realizar una observación y descripción detallada de los síntomas de muerte de ramas productivas ocasionada por hongos productores de picnidios. Realizar un muestreo de los diferentes síntomas encontrados, inducir en las muestras la producción de cirros de esporas mediante cámara húmeda y obtener una colección de aislados monospóricos a partir de esos cirros de esporas. Finalmente, proceder a identificar los aislados mediante técnicas de biología molecular.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de los agentes asociados a muerte de ramas productivas en duraznero y nectarino en el sur del Uruguay, en especial aquellas afectadas por especies del género *Phomopsis*.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar una prospección de montes comerciales de durazneros y nectarinos de la zona sur y observar y describir detalladamente los síntomas que conducen a la muerte de ramas productivas.
- 2) Colectar muestras de los diferentes tipos de síntomas observados asociados a muerte de ramas productivas en estos dos cultivos y generar una colección de aislados monospóricos de hongos productores de picnidios.
- 3) Identificar a nivel de especie y mediante técnicas de biología molecular, los hongos asociados a la muerte de ramas productivas de durazneros y nectarinos en el sur del Uruguay.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 LOS CULTIVOS DE DURAZNERO Y NECTARINO EN URUGUAY

La producción de frutales de hoja caduca en Uruguay tiene enorme importancia social ya que es realizada por agricultores familiares. Asimismo, es responsable de suministrar fruta fresca a la población de las ciudades, especialmente Montevideo que alberga a la mitad de la población del país. Dentro de los frutales de hoja caduca, el duraznero (*Prunus persica*) ocupa el primer lugar en número de productores ya que es cultivado por 600 fruticultores de un total de 929 (aproximadamente dos tercios de los fruticultores cultivan durazneros). El duraznero a su vez se ubica en segundo lugar en área cultivada con 1.477 hectáreas, superado solamente por el manzano. Por su parte los nectarinos (*Prunus var. nectarina*) se ubican en sexto lugar ocupando 174 hectáreas (MGAP. DIEA, 2015). Ambos cultivos pertenecen a la familia Rosaceae y forman parte del grupo de los frutales de carozo junto con el ciruelo (*Prunus doméstica* y *Prunus salicina*; ciruelo europeo y japonés, respectivamente), el almendro (*Prunus dulcis*) y el damasco (*Prunus armeniaca*).

De acuerdo a MGAP. DIEA (2013) la producción de durazno y nectarino está concentrada en la región sur del país en los departamentos de Montevideo, Canelones, San José y Colonia. A su vez existe en el Norte, en los departamentos de Artigas, Salto y Paysandú, un área importante de instalación más reciente que aporta un 8% de la producción total (MGAP. DIEA, 2013).

La mayor parte de la producción de estos dos frutales de carozo se destina al consumo interno, mayoritariamente como fruta fresca y el resto a la industria, para la elaboración de dulces, conservas o jugos. La exportación de estas frutas es de escaso monto.

Los productores usualmente utilizan la estrategia de cultivar diferentes variedades de manera de escalonar la producción. De este modo se logran varios objetivos: uno de ellos es extender el periodo de oferta de fruta en el tiempo, evitando saturar el mercado de frutas. Por otro lado se evita la concentración de tareas (cosecha y empaqueo de la fruta) en un periodo muy corto de tiempo, lo que dificultaría conseguir personal suficiente. Un tercer objetivo es distribuir en el tiempo la demanda de infraestructura de cosecha (cajones, herramientas, línea de empaque) (MGAP. DIEA, 2013).

Las variedades se clasifican según su momento de cosecha: las muy tempranas se cosechan en noviembre, las tempranas en diciembre, las de estación en enero y las tardías a partir de febrero. En el caso de duraznero, entre las más tempranas se encuentran: Earlygrande, Tejano I, Flordaking,

Opedepe, Early Gold y Springcrest, las tempranas son: Junegold, Red Top, Flavorcrest, Forastero, Ginart, White Lady, Summergrand, Summer Pearl, Fla 82-44 W; en tanto, las de estación comprenden: Maria Bianca, Rey del Monte, Elegant Lady, Dixiland, Fayette, Zee Lady; finalmente las tardías son: Pavía Canario, Pavía Manteca, Pavía Rubí, Rey del Monte tardío, O' Henry, Summerseet, Pavía Moscatel, Carnival y Michelini. En cuanto a las variedades de nectarinos, entre las tempranas se encuentran Pelón Lara, Pelón Carolina, Caldesi 2000, Queen Giant Sunsplash; de estación Pelón Fantasía y tardíos Nectared y Flamekis (INIA, 2014).

La Tabla 1 muestra la superficie total plantada y en producción, plantas totales y en producción, producción total y productividad según variedades de duraznero, agrupadas por época de maduración. En la Tabla 2 se muestran la superficie total plantada y en producción, plantas en producción, producción total y productividad según variedades de nectarino, agrupadas por época de maduración.

La superficie total de durazneros es de 1477 hectáreas, de las cuales el 92 % se encuentra en producción. El promedio de plantas por hectárea es de 830. En cuanto a rendimiento, el promedio total es de 13 Mg. de fruta por hectárea y 15 Kg. por planta. Las variedades se clasifican en muy tempranas, tempranas, de estación, tardías y otras sin especificar. Ocupan un 21, 31, 29,12 y 7 por ciento del área plantada respectivamente. A su vez, aportan el 17, 31, 34, 13 y 5 por ciento de la producción total respectivamente.

Tabla 1. Superficie total plantada y en producción, plantas totales y en producción, producción total y productividad según variedades de duraznero, agrupadas por época de maduración

Variedades	Superficie (ha)		Plantas (miles)		Producción (t)	Rendimiento	
	Total	En producción	Totales	En producción		t/ha	Kg/planta
Total	1477	1362	1226	1132	17224	13	15
Muy tempranas							
Sub total	310	287	249	229	2849	10	12
Earlygrande	179	167	144	132	1513	9	11
Tejano I	53	46	41	37	653	14	18
Flordaking	27	27	20	20	214	8	11
Opedepe	36	32	34	30	369	12	12
Early Gold	11	11	8	8	53	5	6
Springcrest	3	3	2	2	48	18	25

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 1. (Continúa de la página anterior)

Variedades	Superficie (ha)		Plantas (miles)		Producción	Rendimiento	
	Total	En prod.	Totales	En prod.		t/ha	Kg/planta
Tempranas							
Sub total	458	435	375	356	5342	12	15
Junegold	165	158	127	122	1809	11	15
Flavorcrest	117	115	103	102	1428	12	14
Don Alberto	54	41	42	32	662	16	20
Richlady	15	15	14	14	152	10	11
Southland	9	9	7	7	75	8	11
Red High	6	5	3	3	60	11	18
Springlady	5	5	4	4	74	16	19
Red Globe	3	3	3	3	18	6	7
San Francisco	3	3	3	3	33	10	12
Red Top	2	2	2	2	29	12	13
Otros	4	4	4	4	57	16	13
De estación							
Sub total	428	398	366	340	5896	15	17
Dixiland	211	196	190	179	3551	18	20
Rey del Monte	116	104	87	78	1036	10	13
Elegant Lady	72	72	62	62	1050	15	17
Flayette	17	11	14	10	183	16	16
Brunetto	12	12	11	11	76	7	7
Otros	2	0	1	0	5	16	14
Tardías							
Sub total	180	169	146	137	2169	13	16
Pavía canario	87	87	74	74	1219	14	17
Otros pavía	36	31	29	25	233	8	9
Pavía manteca	29	27	20	18	332	12	18
Pavía rubí	8	7	6	5	130	20	26
Rey del Monte tardío	5	5	3	3	41	8	13
O Henry	5	5	5	5	82	17	16
Summerset	4	3	3	3	60	18	23

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 1. (Continúa de la página anterior)

Variedades	Superficie (ha)		Plantas (miles)		Producción	Rendimiento	
	Total	En prod.	Totales	En prod.		t/ha	Kg/planta
Pavía	3	2	3	2	19	10	11
Moscatel							
Carnival	2	2	2	2	41	17	20
Michelini	1	1	1	1	13	17	20
Otras sin clasificar	95	72	85	66	915	13	14

Fuente: MGAP. DIEA (2015).

Los nectarinos ocupan un área total de 157 hectáreas, de las cuales el 84,7 % se encuentra en producción. El promedio de plantas por hectárea es de 745. En cuanto a rendimiento, el promedio total es de 14 Mg. de fruta por hectárea y 16 kg. por planta. Las variedades se clasifican en muy tempranas, tempranas, de estación y otras sin especificar. Ocupan un 3, 20, 46 y 31 por ciento del área plantada respectivamente. A su vez, aportan el 2, 24, 49 y 25 por ciento de la producción total respectivamente.

Tabla 2. Superficie total plantada y en producción, plantas en producción producción total y productividad según variedades de nectarino, agrupadas por época de maduración.

Variedades	Sup. Total (has)	Sup. en prod.	Plantas en prod. (miles)	Producción (t)	Productividad (t/ha)	Prod. (Kg/ha)
Total	157	133	117	1816	14	16
Muy tempranas						
Early diamond	1	1	1	9	10	10
Sunlite	3	3	2	43	16	22
Tempranas						
Summergrand	2	2	2	27	12	12
Lara	17	17	15	190	11	13
Carolina	11	10	10	230	22	23
De estación						
Fantasia	71	61	52	855	14	16
Springred	1	1	1	5	4	4
Otras sin clasificar	48	38	34	457	12	13

Fuente: adaptado de MGAP. DIEA (2015).

Los cultivos de durazneros y nectarinos en Uruguay son afectados por diversas enfermedades. Entre ellas se destacan las ocasionadas por hongos que producen la muerte de ramas productivas. Estos hongos impactan directamente en la producción del año e indirectamente en los años siguientes al debilitar el árbol. El principal género de hongo causante de la muerte de ramas es *Phomopsis* y con menor importancia aparece *Monilinia*.

Monilinia fructícola que es un hongo conocido por ocasionar podredumbre de frutos, pero además en la primavera temprana durante la floración de durazneros y nectarinos, suele producir atizonado de flores para luego invadir la rama anillándola pudiendo, en ocasiones, causarle la muerte (Malvarez et al. 2004, Mondino 2014).

Por otra parte especies del género *Phomopsis* ocasionan la enfermedad conocida con el nombre de viruela de la púa cuyo síntoma principal es la muerte de ramas productivas. Esta enfermedad ha incrementado su incidencia en los últimos años y se ha transformado en uno de los principales problemas sanitarios del cultivo de durazneros y nectarinos.

2.2 LA VIRUELA DE LA PÚA

La viruela de la púa, también llamada cancro en constricción (Lalancette et al., 2003), se observó por primera vez en la región noreste de Estados Unidos en huertos de Nueva Jersey en 1934. Posteriormente se informó su presencia en Maryland, Delaware, Virginia, Nueva York, Massachusetts y Rhode Island durante los años 1940 y 1950. En el sureste de Estados Unidos, la enfermedad surgió en Alabama en la década de 1990 y más tarde fue citada su presencia en Georgia y Carolina del Sur (Lalancette y Polk, 2000).

Su importancia radica en el hecho de que causa muerte de las ramas del año afectando en forma directa a la producción de fruta. La muerte de las ramas productivas genera, además de las pérdidas de cosecha, el debilitamiento del árbol y, en el caso de plantaciones nuevas, dificultades en la formación de la planta (Mondino et al., 2010).

En un estudio realizado en Nueva Jersey, se demostró que en cultivos gravemente infectados las pérdidas de producción pueden alcanzar valores del 20 al 30% (Lalancette y Polk, 2000). En Uruguay según Leoni (2004), la viruela de la púa es, junto con la podredumbre morena causada por *Monilinia fructicola* y la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, una de las principales enfermedades que afectan al cultivo en nuestro país.

2.2.1 Síntomas y signo

En la primavera, cuando comienza la brotación de los durazneros, algunas yemas afectadas no brotan. Rodeando a la yema afectada se forma un cancro de coloración blanquecina. Posteriormente las hojas de esa rama productiva se secan rápidamente y quedan extendidas y adheridas a la rama. A este síntoma se le denomina “síntoma de hoja bandera”, y ocurre por efecto de una toxina, la fucicoccina, liberada por el hongo que impide el cierre de las estomas, favoreciendo la rápida deshidratación (Turner y Graniti, 1969). Finalmente la rama productiva muere y las hojas terminan por caer. Sobre la zona blanquecina que rodea a la yema suelen verse picnidios del hongo que asoman a modo de puntuaciones negras. Con la ayuda de una lupa puede observarse que los picnidios se encuentran inmersos en el tejido vegetal y que emergen del mismo. En condiciones de alta humedad, estos picnidios exudan cirros que consisten en una masa de conidios que se mantienen unidos por una sustancia mucilaginosa y toman forma enrollada (Mondino et al., 2010).

2.2.2 Agente causal

La viruela de la púa es ocasionada por especies de hongos del género *Phomopsis*. En otros países como Estados Unidos, España o Portugal se ha identificado a *Phomopsis amygdali* (Delacr.) la especie causante de esta enfermedad (Tuset y Portilla, citados por Lalancette et al. 2003, Agrios 2005). La forma perfecta o teleomorfo de esta especie es *Dhiaporte amygdali*. Este hongo pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Subclase Sordariomycetadae, Orden Diaporthales y a la familia Diaportaceae.

2.2.3 Ciclo de la enfermedad

Según Lalancette et al. (2003), en otoño el hongo ingresa a la planta principalmente a través de las cicatrices dejadas por la abscisión de las hojas; mientras que en la primavera ingresa por las heridas que dejan las escamas de la yema al caer durante la brotación, por las flores o por las heridas que dejan los frutos al caer (mediante raleo o caída natural).

En el otoño, una vez que ingresa, inverna en el interior de las ramas, luego en la primavera temprana se desarrollan los canchros, posteriormente aparece el síntoma de hoja bandera que consiste en el secado rápido de la hoja y posteriormente se produce la muerte de la rama afectada. Sobre los canchros aparecen las estructuras reproductivas conocidas como picnidios. Éstos, en condiciones de alta humedad relativa exudan cirros de conidios los que se dispersan por el salpicado del agua de lluvia.

En caso de que las condiciones ambientales sean favorables ocurrirán nuevos ciclos de infección en ramas nuevas durante el resto de la primavera y verano.

2.2.4 Epidemiología

Durante el otoño y a medida que transcurren los días, las heridas producidas durante la caída de las hojas, se hacen más resistentes al ingreso del patógeno. En el invierno pueden producirse infecciones pero en menor cantidad que en primavera y otoño (Lalancette y Robison, 2001). Asimismo, cuando la humedad ambiente es de entre 90 y 100 %, sobre las heridas se forman suberinas, gomas y peridermo, estas sustancias y el tejido protector reducen la capacidad de penetración del hongo.

Éste hongo puede esporular entre 0°C y 37°C, la temperatura óptima para la formación de cirros es de 19°C a 20°C, mientras que la máxima producción de conidios ocurre entre los 22 a 23°C. A temperaturas óptimas, la mayor esporulación ocurre entre las 16 y 48 horas de iniciado el período de alta humedad (Lalancette et al., 2003).

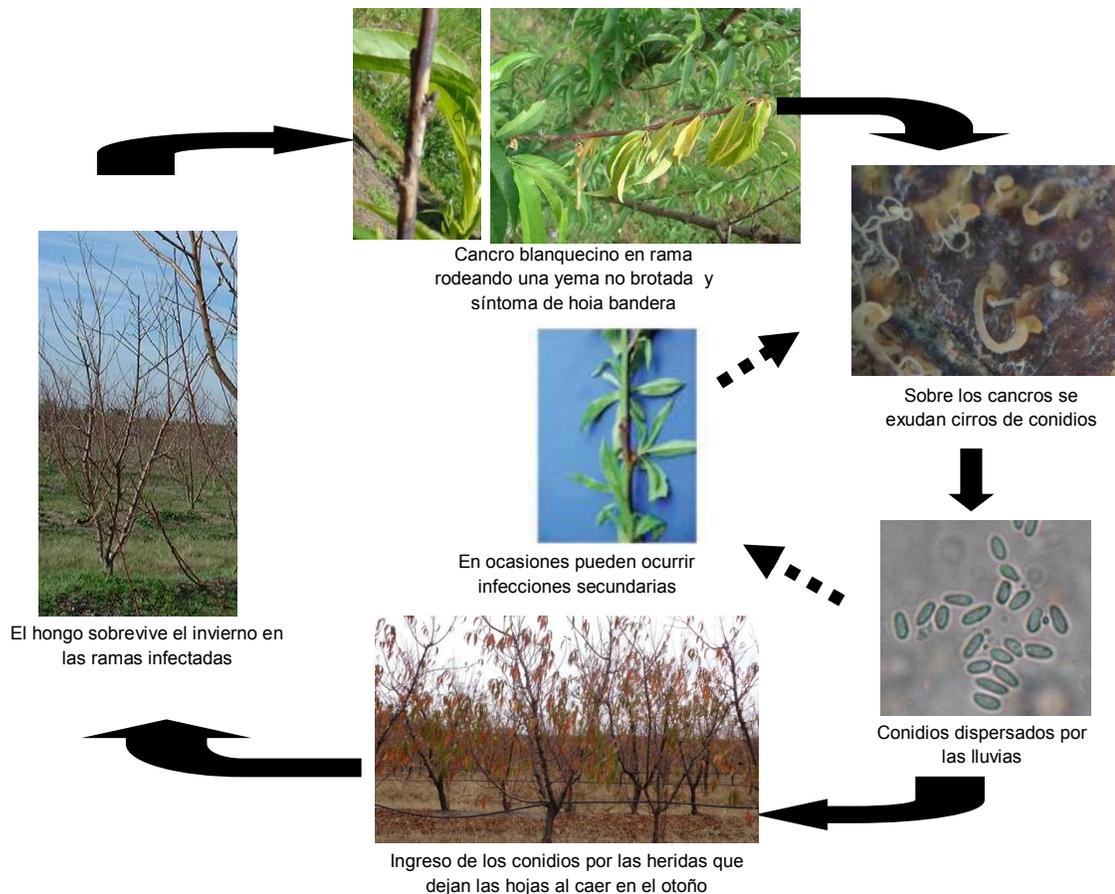


Figura 1. Ciclo de la viruela de la púa causado por *Phomopsis sp.* en duraznero y nectarino.

Según Lalancette et al. (2003) puede haber producción de conidios en números significativos (10^6 a 10^7 por cancro) durante todo el año, ya que los picnidios se encuentran siempre activos. Por eso, ha sido postulado que *P. amygdali* actúa como un *r* estratega, manteniendo un alto nivel de esporulación en todo momento. La cantidad de conidios por tanto, no es un factor limitante para generar la epidemia. Una epidemia se puede generar con períodos cortos de humedad relativa y amplios rangos de temperaturas. Sin embargo la formación de picnidios varía a lo largo del año, siguiendo un patrón sinusoidal. Durante el otoño se producen la mayor cantidad de picnidios, mientras que en primavera la menor cantidad (Lalancette y Robison, 2001).

2.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Phomopsis*

2.3.1 Identificación mediante características morfológicas

Los Diaporthales se caracterizan morfológicamente por poseer peritecios de color marrón a negro inmersos en el estroma o en el sustrato. Carecen de paráfisis verdadera en la madurez. Poseen ascas unitunicadas que flotan libres en la madurez y tienen un anillo refractivo en su extremo (Rossman et al., 2007).

En cuanto a las características típicas del género *Phomopsis* las colonias son de color blanco cremoso en medio PDA, con crecimiento concéntrico y ondas lobuladas. A veces forma clamidosporas en cadena. Cuando se mantienen por un tiempo suficiente bajo ciclos alternos de luz y oscuridad generan picnidios de entre 100 y 250 μm (Uddin y Stevenson, 1998).

Los picnidios son usualmente solitarios eustromaticos, globosos o aplanados, a veces elipsoidales de color marrón oscuro de 180 a 550 μm con ostíolos. Los conidióforos son hialinos cilíndricos escasamente ramificados y septados en la base (Ogawa et al., 1995).

La formación de conidios es de tipo fialídica (las células conidiógenas presentan una forma de florero o botella), produce esporas de tipo alfa y beta (Kanematsu, 1999). Los alfa conidios son hialinos y de forma oval a fusoide, los beta conidios, en tanto, son hialinos, largos, estrechos y con una curvatura característica (Agrios, 2005). Ambos tipos de conidios deberán estar presentes para que al hongo se lo considere dentro del género *Phomopsis*. La mayoría de las esporas que se generan son alfa conidios, mientras que los beta conidios se forman ocasionalmente (Tuset y Portilla, citados por Lalancette et al. 2003, Agrios 2005).

2.3.2 Identificación mediante características moleculares

Para la identificación molecular de algunas especies dentro del género *Phomopsis* se han desarrollado cebadores específicos, como los descritos por Shishido et al. (2009) , Vedashree et al. (2015) para *Phomopsis sclerotioides* y *Phomopsis azadirachtae*, respectivamente. En otros estudios se usó el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) para identificar especies dentro de éste género. Como ejemplo, Moleleki et al. (2002) usaron esta herramienta para identificar *Diaporthe perijuncta* y *Diaporthe ambigua*, Rolshausen et al. (2004) para *Phomopsis viticola* y Stewart (2015) para *Diaporthe phaseolorum*.

Otra forma muy utilizada es el análisis de secuencias de diversas regiones génicas. La región génica más utilizada es la región ITS que incluye a las secuencias de los espaciadores transcriptos internos ITS1 e ITS2 y el gen de 5,8S que codifica para el ARN ribosomal. Los cebadores más utilizados para amplificar estas regiones son ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). Algunos ejemplos de identificación usando esta región incluyen los trabajos de Farr et al (2002) que determinaron que *Diaporthe ambigua*, *D. perijuncta*, *Phomopsis amygdali*, *P. vaccinii*, *P. asparagi* y *P. longicolla* se encontraban entre las especies causantes de enfermedades en arándanos. A su vez Van Niekerk et al. (2005) comprobaron la presencia de *Diaporthe ambigua*, *D. australafricana*, *D. helianthi*, *D. perijuncta*, *D. viticola*, *Phomopsis amygdali*, *P. viticola*, y *P. vitimegaspora* en plantas de vid. Finalmente, Garibaldi et al. (2011) utilizando esta región identificaron *Phomopsis cucurbitae* como patógeno del melón.

Otras regiones génicas que se han utilizado para la identificación de especies este género son: factor de elongación 1- α , β tubulina, calmodulina (Udayanga et al. 2012, Gao et al. 2014, Shirahatti et al. 2015) histona 3 (Gomes et al., s.f.) y actina¹.

2.4 MANEJO DE VIRUELA DE LA PÚA

Según Mondino et al. (2010), la principal estrategia para manejar la viruela de la púa es evitar las condiciones de estrés del árbol. Se debe evitar la fertilización nitrogenada excesiva, eliminar ramas afectadas para reducir la producción de inóculo secundario, realizar prácticas que favorezcan la ventilación de la copa y la circulación del aire, así como establecer distancias de plantación y sistemas de conducción tendientes a favorecer el rápido secado de las ramas. La instalación de cortinas rompe-viento ayudaría a disminuir la diseminación de la enfermedad por lluvia y por viento.

En lo que respecta al control químico, según los mismos autores no existe investigación nacional sobre la eficiencia de los fungicidas autorizados en los programas de producción integrada. En otros países se aplican fungicidas a caída de hojas para evitar las infecciones. Estos tratamientos se deben realizar en función de los pronósticos meteorológicos ya que son necesarias lluvias para la dispersión de las esporas. Una vez que el hongo ha colonizado la rama, no son efectivas las aplicaciones. Según Schnabel y Lalancette (s.f.) los fungicidas más efectivos en orden de eficacia son: muy efectivos: chlorothalonil > captan > thiram > ferbam; efectivos: fungicidas del tipo IBE (fenbuconazole, propiconazole) > benzimidazoles (metil-tiofanato) >

¹ Annesi, T.; Luongo, L.; Vitale, S.; Galli, M.; Belisario, A. s.f. Characterization and pathogenicity of *Phomopsis theicola* anamorph of *Diaporthe foeniculina* causing stem and shoot cankers on sweet chestnut in Italy (sin publicar).

estrobilurinas (azoxystrobin, trifloxystrobin); no efectivo: azufre. En nuestro país no existen productos registrados para el control de esta enfermedad.

Aunque sólo unas pocas opciones de control están disponibles, cada una de ellas contribuye a una reducción global de la enfermedad. Una forma de disminuir la enfermedad es plantar variedades resistentes. Hay evidencia de que algunas variedades son más susceptibles que otras. Una encuesta entre los cultivadores de durazno de Carolina del Sur reveló que las siguientes variedades son altamente susceptibles: Contender, Cresthaven, Emperatriz, Springcest, Redhaven, Red Globe y la serie Baby Gold. En Nueva Jersey, los altos niveles de infección se han observado en Encore, Biscoe, Jerseyglo, Autumn glo, Cresthaven, y Redhaven. Factores tales como el estrés por sequía o el uso de exceso de nitrógeno pueden aumentar la susceptibilidad de las variedades (Schnabel y Lalancette, s.f.).

La poda es un método eficaz para la reducir las infecciones de otoño porque la madera muerta colonizada es una importante fuente de inóculo. Si se hace previa a la caída de la hoja, como parte de la rutina de la poda de verano, la incidencia puede reducirse en un 40% (Schnabel y Lalancette, s.f.).

Uddin y Stevenson (1998) plantean realizar podas selectivas dos veces al año, cada una siguiendo el mayor período de infección. De esta manera se reduciría significativamente la cantidad de infección. Los períodos planteados para el hemisferio Norte son: octubre o noviembre y finales de mayo o principios de junio. El primer período no resulta práctico a los efectos de manejo y a su vez expondría a los árboles a patógenos y daños por frío. El segundo período, en cambio es más práctico si se combina con la poda en verde. La reducción en la incidencia de la enfermedad cuando se realizan podas en estas fechas y se retiran las ramas del monte va desde valores no significativos a un 21 %, por lo que estos autores mencionan que ninguna de estas medidas es totalmente eficaz en el control de ésta enfermedad.

Dada la pérdida de rendimiento por la viruela de la púa y la falta de controles de probada eficacia, la eliminación de bloques de menor productividad puede ser la mejor alternativa económica. En este caso, el bloque debería ser reemplazado con un cultivar menos susceptible (Schnabel y Lalancette, s.f.).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS EN CAMPO Y COLECTA DE MUESTRAS

Durante la primavera de 2012 se visitaron un total de diez predios en la región sur del país, principal región de producción de duraznero y nectarino en Uruguay. Las zonas muestreadas fueron: Melilla en el departamento de Montevideo y Progreso y Juanicó en el departamento de Canelones.

Cada uno de los montes visitados se recorrió en forma aleatoria observando las ramas del año. Aquellas ramas que exhibían alguna alteración, fueron examinadas detalladamente para determinar qué tipos de síntoma presentaban. Las ramas que presentaban síntomas o signos de *Monilinia fructícola* fueron descartadas en este estudio.

En cada monte se colectaron, cuando fue posible, al menos 10 muestras con síntomas de canchros y/o muerte de la rama productiva. En el muestreo se incluyeron ramas con síntomas de viruela de la púa (ramas con canchros blanquecinos, presentando puntuaciones negras y síntomas de hoja bandera) y otras con otros síntomas (canchros de color marrón, ramas muertas sin síntoma de hoja bandera, ramas muertas sin hojas). Todas las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, dónde fueron procesadas.

3.2 OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS

Una vez en el laboratorio de fitopatología, las muestras fueron colocadas individualmente en cámara húmeda. De cada monte se seleccionaron aproximadamente de 2 a 5 muestras procurando abarcar los diferentes tipos de síntomas. Se cortaron las ramas uno o dos cm por debajo y por encima del canchro y se colocaron en placas de Petri con un trozo de algodón en su interior embebido en agua, de manera de mantener la humedad relativa alta, y se sellaron con film. Al cabo de cinco días se observó bajo lupa la presencia de picnidios exudando cirros de conidios. Las muestras que presentaban cirros se seleccionaron para realizar los cultivos monospóricos.

Las muestras en las que la cámara húmeda indujo la producción de cirros de conidios, fueron seleccionadas para obtener aislados monospóricos. Con la ayuda de aguja hipodérmica, de cada muestra se escogió un cirro y se colocó en un microtubo de 2 mL conteniendo 100 μ L de agua destilada estéril. Posteriormente se agitó en vórtex por unos segundos. Luego se determinó la concentración de conidios utilizando un hematocitómetro y se ajustó a $1,0 \times 10^3$ conidios /mL mediante dilución en agua destilada estéril.

Inmediatamente, se sembraron y dispersaron (utilizando asa de Drigalsky) 100 μL de cada suspensión, en placas con medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) con agregado del antibiótico sulfato de streptomina (Sigma-Aldrich, China) ($0,2\text{g mL}^{-1}$) para evitar la multiplicación de bacterias. Las placas fueron selladas con film e incubadas en estufa a 25°C en oscuridad. Luego de transcurridas 24 horas se seleccionó con la ayuda de lupa y de microscopio una espora germinada y relativamente aislada de las demás, la que fue repicada con aguja hipodérmica a una nueva placa de PDA obteniendo así los cultivos monospóricos. Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C durante dos días y luego al menos siete días con 12 horas de fotoperiodo con luz ultravioleta cercana (T8 BLB de 220 V) más iluminación fluorescente (Luz do día, osram universal 20 W, k8a8 C.6, Brasil). Al cabo de este tiempo se realizó una observación del aspecto de las colonias, y de la presencia de picnidios y conidios.

Los cultivos monospóricos se conservaron de dos formas: en papel de filtro colonizado y deshidratado con sílica-gel (Peever et al. 1999, con modificaciones) y colocando discos de las colonias crecidas en medio PDA en crioviales conteniendo glicerol al 15% (Pegg, 2007), ambos a -20°C .

3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

3.3.1 Extracción de ADN

Todos los aislados monospóricos se cultivaron en medio PDA de 5 a 7 días a 25°C en ciclos de luz blanca más cercano al UV y oscuridad. Posteriormente se extrajo el ADN a partir de micelio y estructuras reproductivas desarrolladas (picnidios y conidios). El método de extracción utilizado es el descrito en Palocci et al. (1999) con modificaciones y se detalla a continuación.

1. Retirar micelio y esporas con una espátula estéril y colocarlo en microtubo de 1.5 mL. Agregar 200 μl de buffer de lisis (200mM Tris HCl pH 7.5; 250mM NaCl, 0.5% SDS, 25 mM EDTA+NaOH al 10%).
2. Llevar al freezer por al menos 2 horas.
3. Macerar micelio y agregar otros 200 μl de buffer de lisis. Mezclar en vórtex por 10 segundos y llevar a baño a 65°C por 30 minutos
4. Agregar 300 μl de NaCl 1M+0.1v/v Twing. Invertir tubo suavemente para homogeneizar.
5. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C .
6. Transferir sobrenadante a nuevo tubo.
7. Agregar 1 volumen de isopropanol a -20°C . Mezclar y colocar en freezer por al menos 30 minutos.
8. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos. Volcar sobrenadante.
9. Agregar 200 μl de etanol 70% a -20°C y centrifugar por 2 minutos a

- 10000rpm a 4°C.
10. Volcar sobrenadante.
 11. Secar pellet por lo menos 2 horas (temperatura ambiente) o en estufa a 50°C hasta que se evapore totalmente el alcohol.
 12. Resuspender el pellet en 50µl de TE, llevar a baño a 65°C por 15 minutos.
 13. Almacenar ADN obtenido en microtubos en freezer a -20°C.

3.3.2 Amplificación por PCR y secuenciación

Para la identificación de los aislados se amplificó y secuenció la región ITS del ADNr utilizando los cebadores universales nucleares ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990).

La mezcla de reacción contenía 1X de tampón (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM MgCl₂), 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 de ADN extraído. La mezcla se ajustó con agua mQ (EASYpure™ LF, Barnstead Thermolyne Corporation) a un volumen final de 40 µL.

Las amplificaciones se efectuaron utilizando un termociclador MultiGene™ Mini (Labnet Internacional Inc., Estados Unidos) en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 34 ciclos compuestos por desnaturalización a 94°C por 45 s, hibridación a 57°C por 30 s y 45 s de extensión a 72°C. El paso final fue 72°C por 10 min para completar las extensiones.

Para confirmar que efectivamente se obtuvo amplificación en la PCR, se corrió una muestra de 2 µL de los productos obtenidos 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). Se incluyó marcador de peso molecular constituido por un mezcla de bandas de ADN de 100 pb de diferencia (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 48mL de agua) durante al menos 30 minutos y se expusieron a luz UV en transiluminador (DyNA Light Dual Intensity UV Transiluminator, Labnet Internacional Inc., Estados Unidos). Los geles se fotografiaron con un sistema de foto documentación DigiDoc-It™ (Ultra-Violet Products Ltd., Reino Unido).

Finalmente los productos resultantes fueron secuenciados una parte en MacroGen Inc. (Corea) y la otra en el Instituto Pasteur de Montevideo.

3.3.3 Análisis filogenético

Las secuenciaciones obtenidas se alinearon manejando el programa informático Clustal W (Larkin et al., 2007) implementado en el programa MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011). Luego fueron editadas utilizando como apoyo los cromatogramas. En el alineamiento se incluyeron secuencias de especies similares o filogenéticamente cercanas obtenidas del GenBank (Tabla 3). Se realizó el análisis filogenético mediante el método de Máxima Parsimonia en el programa MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011). En la reconstrucción filogenética los espacios resultantes del alineamiento fueron tratados como datos faltantes. Todos los caracteres fueron tratados sin importar el orden y con igual peso. El soporte de los nodos de los árboles más parsimoniosos se obtuvo mediante 1000 réplicas de bootstrap (Delgado, 2013).

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

Especie	No. GenBank	Origen	Húésped	Autor/es
<i>Phomopsis amygdali</i>	GQ281793.1	Portugal	<i>Prunus dulcis</i>	Diogo et al. (2009).
<i>Diaporthe amygdali</i>	KC343019.1	Sudáfrica	<i>Vitis vinifera</i>	Gomes et al. (2013).
<i>Diaporthe infecunda</i>	KC343132.1	Brasil	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Gomes et al. (2013).
<i>Phomopsis sp.</i>	HQ141526.1	Italia	<i>Glycine max</i>	Riccioni et al. (no publicado, extraído de Benson et al., 2011).
<i>Phomopsis sp.</i>	HQ141528.1	Italia	<i>Glycine max</i>	Riccioni et al. (no publicado, extraído de Benson et al., 2011).
<i>Valsa leucostoma</i>	KF294008.1	China	<i>Liriodendron tulipifera</i>	Sun y Yan (no publicado, extraído de Benson et al., 2011).

4. RESULTADOS

4.1 OBSERVACIÓN DE SÍNTOMAS EN EL CAMPO

Se visitaron un total de diez predios, seis ubicados en Montevideo y cuatro en Canelones. En cada predio se recorrieron un promedio de uno a tres montes de duraznero y/o nectarino, siendo 23 el número total de montes muestreados (18 de durazneros y 5 de nectarinos).

En la mayoría de los montes visitados se observaron anomalías en ramas del año tanto en duraznero como en nectarino. La alteración más frecuente consistió en la presencia de síntoma de hoja bandera (ramas con hojas extendidas) en diferentes grados de avance (hojas de color verde pálido, ramas con hojas extendidas marchitas, ramas con hojas marchitas a necróticas). También se encontraron ramas muertas cuyas hojas ya habían caído (estadio final de este proceso que culmina con la muerte de la rama) (Figura 2). Asociada a estos síntomas se observó consistentemente la presencia de una yema muerta ubicada generalmente en el extremo basal de la rama. Rodeando esta yema, habitualmente se observó la presencia de un cancro de color blanquecino. En la mayoría de los casos, se observó la presencia de picnidios como pequeñas estructuras de color negro (Figura 3). En algunos casos (poco frecuentes) la porción apical de una rama donde se encontraba una yema no brotada y cancro blanquecino presentaba el resto de las yemas no brotadas. Esto se tomó como indicio de que la muerte de la rama ocurrió con anterioridad al inicio de la brotación.

También se observaron ramas cuyas hojas estaban marchitas, necróticas o habían caído con una yema no brotada rodeada por un cancro, pero en este caso el cancro era de color amarronado. En algunos casos se observó presencia de picnidios sobre estos cancros.



Figura 2. Diferentes grados de avance del síntoma de hoja bandera: hojas en el proceso inicial de deshidratación (A), hojas enrolladas y deshidratadas (B), hojas necróticas (C), rama muerta sin hojas (D).

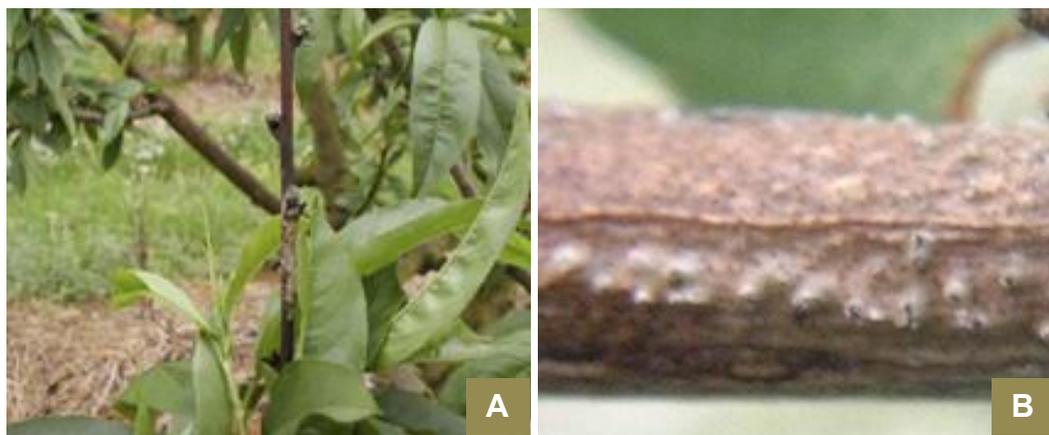


Figura 3. Detalle de la yema no brotada rodeada de cancro blanquecino (A) y presencia de picnidios de color negro sobre el cancro (B).

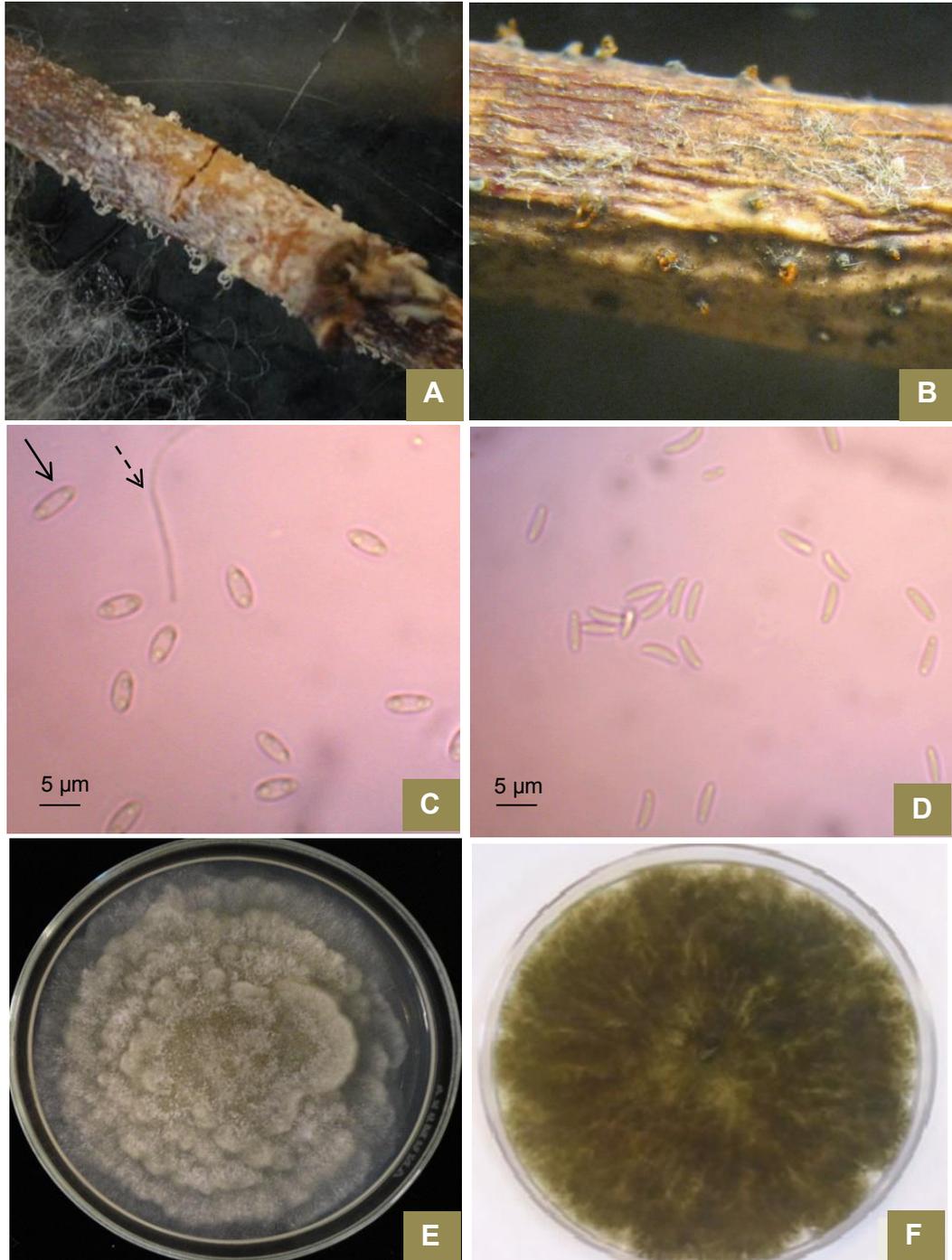


Figura 4. Estructuras y colonias obtenidas a partir de las

muestras sometidas a cámara húmeda. Cirros blanquecinos, alfa (flecha entera) y beta conidios (flecha punteada) y colonias típicas del género *Phomopsis* (A, C, E), cirros anaranjados, conidios provenientes de los cirros anaranjados y colonias de color verde oliva a negro (B, D, F).

4.2 OBTENCIÓN DE MONOSPÓRICOS

Se procesaron 72 muestras en cámara húmeda incluyendo aquellas que presentaban síntomas de viruela de la púa y también las que presentaban síntomas diferentes a los descriptos para esta enfermedad. Luego de 48 horas en cámara húmeda, todas las muestras con síntomas de viruela de la púa desarrollaron cirros en forma de rulo de color blanquecino (Figura 4). Por otro lado, sólo en tres de las muestras que no presentaban los síntomas de viruela de la púa se pudieron observar cirros, pero en este caso de color anaranjado. Estas muestras correspondían a aquellas en que el cancro era amarronado. En los cirros de color blanquecino se pudo observar la presencia de alfa conidios típicos del género *Phomopsis*, mientras que los cirros de color anaranjado contenían conidios hialinos, unicelulares, curvados, con los extremos redondeados, y de tamaño similar a los alfa conidios de *Phomopsis* (Figura 4).

Finalmente se obtuvieron un total de 51 aislados monospóricos (Tabla 4). A los 7 días de crecimiento, las colonias presentaron micelio de color blanquecino con ondas de crecimiento de forma lobulada típico del género *Phomopsis*, excepto las tres colonias provenientes de los cirros de color anaranjado (P16, P120 y P29). En este caso las colonias eran de color verde oliva a negro y no presentaban ondas de crecimiento de forma lobulada (Figura 4).

Tabla 4. Aislados monospóricos obtenidos de las muestras con síntomas asociados a muerte de ramas productivas, colectadas de plantaciones comerciales de durazneros y nectarinos ubicados en el sur del Uruguay.

Aislado	Húésped	Zona Geográfica	Especie
P 1	Durazno / Opedepe	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 2	Durazno / Opedepe	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 3	Nectarino / Fantasia	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis</i> sp.
P 4	Nectarino / Fantasia	Melilla / Montevideo	<i>Diaporthe infecunda</i>
P 5	Nectarino / Fantasia	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 6	Nectarino / Fantasia	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 7	Nectarino / Fantasia	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 8	Nectarino / Fantasia	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 9	Nectarino / s/d.	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 10	Nectarino / s/d.	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 11	Nectarino / s/d.	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 12	Durazno / Forastero	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 13	Durazno / Forastero	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 14	Durazno / Forastero	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 15	Durazno / Don Alberto	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 16	Durazno / Flavor crest	Melilla / Montevideo	<i>Valsa</i> sp.
P 17	Durazno / Flavor crest	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 18	Durazno / Flavor crest	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 19	Durazno / Flavor crest	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 20	Durazno / Flavor crest	Melilla / Montevideo	<i>Valsa</i> spp.
P 21	Durazno / Ginart	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 22	Durazno / Ginart	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 23	Durazno / Ginart	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 24	Durazno / Ginart	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 25	Durazno / Tejano	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 26	Durazno / Tejano	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 27	Durazno / Tejano	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 28	Durazno / Tejano	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 29	Durazno / Tejano	Melilla / Montevideo	<i>Valsa</i> sp.
P 30	Durazno / Opedepe	Melilla / Montevideo	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 31	Durazno / Opedepe	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 32	Nectarino / Spring red	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 33	Nectarino / Spring red	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 34	Durazno / Junegold	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 35	Durazno / Junegold	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 36	Durazno / Forastero	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 37	Durazno / Forastero	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 38	Durazno / Flordaking	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 39	Durazno / Flordaking	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 4. (Continúa de la página anterior)

Aislado	Húésped	Zona Geográfica	Especie
P 40	Durazno / Dixiland	Juanicó / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 41	Durazno / Dixiland	Juanicó / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 42	Durazno / Pavía blanco	Juanicó / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 43	Durazno / Fla 82-44	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 44	Durazno / Fla 82-44	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 45	Durazno / Fla 82-44	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 46	Durazno / Opedepe	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 47	Durazno / Opedepe	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 48	Durazno / Elegant Lady	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 49	Durazno / Elegant Lady	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 50	Durazno / Elegant Lady	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>
P 51	Durazno / Rich Lady	Progreso / Canelones	<i>Phomopsis amygdali</i>

4.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Todos los aislados fueron amplificados con los cebadores ITS1/ITS4. El producto obtenido correspondió a un fragmento de ADN de aproximadamente 560 pb. (Figura 5).

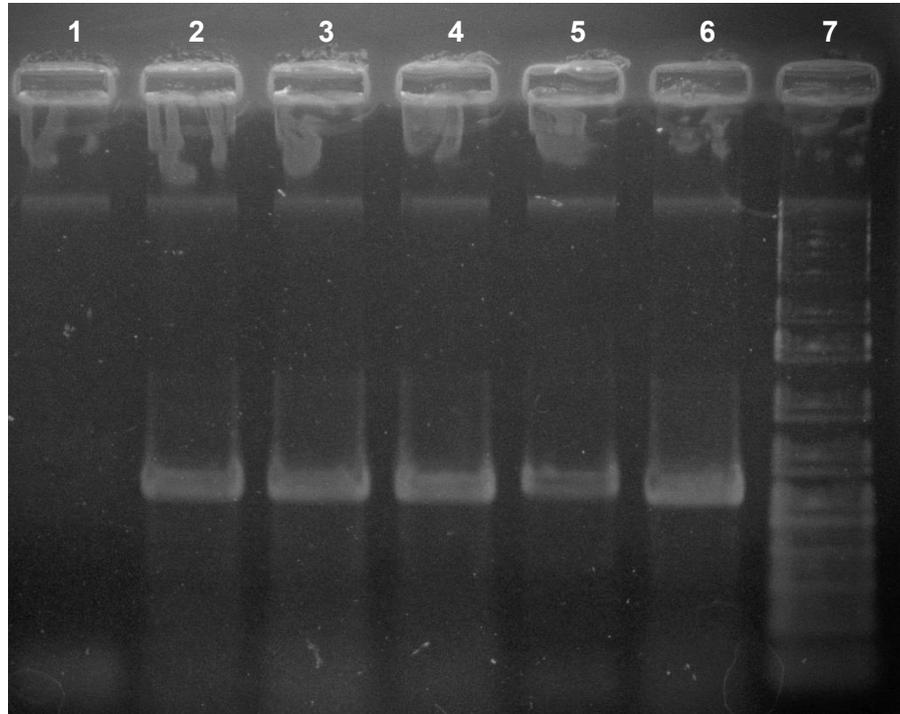


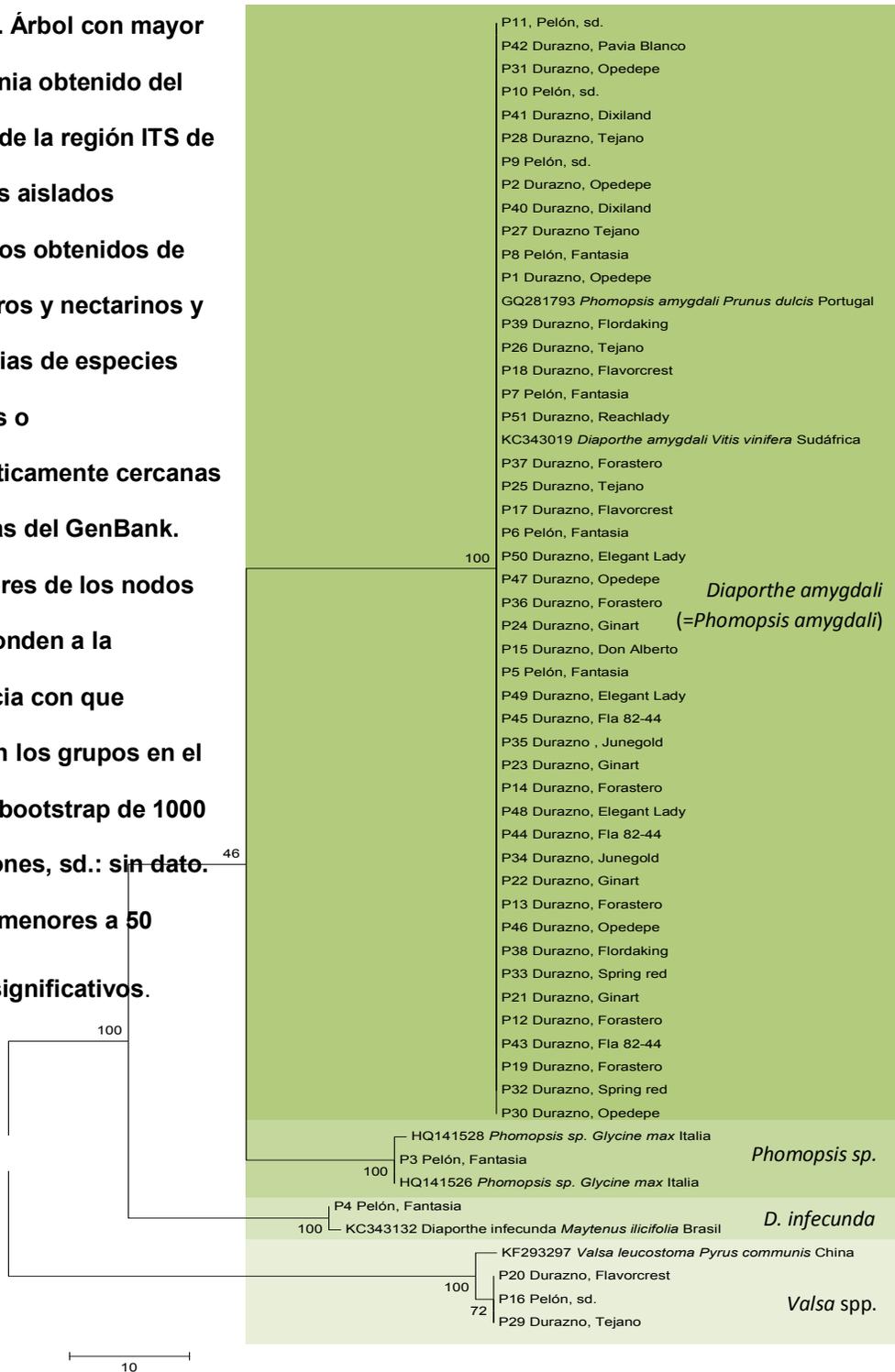
Figura 5. Productos amplificados mediante PCR utilizando los cebadores ITS1/ITS4. Carril 1: control negativo, carriles 2 a 6: aislados P 34, P35, P36, P37, P38, y carril 7 marcador de peso molecular.

El alineamiento de las secuencias editadas de la región ITS de los 51 aislados uruguayos y las seis secuencias obtenidos del GenBank, se compuso de 496 nucleótidos, de estos 94 fueron parsimoniosamente informativos. El análisis por Máxima Parsimonia resulto en un árbol más parsimonioso que se muestra en la Figura 6.

Se identificaron dos clados principales con 100 % de valor de bootstrap, uno agrupó a todos los aislados pertenecientes al género *Phomopsis* y el otro a los del género *Valsa*. En el clado que contiene las especies del género *Phomopsis* se observaron tres clados menores todos con 100% de valor de bootstrap. Uno de ellos incluye las secuencias de especies identificadas como *P.*

amygdali y la mayor parte de los aislados uruguayos (46 aislados), otro agrupa *Phomopsis* no identificadas a nivel de especie y el aislado P3 y el tercero agrupa a la especie *Diaporthe infecunda* y el aislado P4. Finalmente los aislados P16, P20, y P29 quedaron incluidos en el otro clado principal, que incluye secuencias de aislados del género *Valsa*. Estos tres aislados eran los que presentaban características morfológicas y culturales diferentes al resto de los aislados: cirros de color anaranjado, conidios hialinos, unicelulares, curvados, con los extremos redondeados y de tamaño similar a los alfa conidios de *Phomopsis*, y colonias verde oliva a negro.

Figura 6. Árbol con mayor parsimonia obtenido del análisis de la región ITS de todos los aislados uruguayos obtenidos de durazneros y nectarinos y secuencias de especies similares o filogenéticamente cercanas obtenidas del GenBank. Los valores de los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis bootstrap de 1000 repeticiones, sd.: sin dato. Valores menores a 50 no son significativos.



5. DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó un estudio exhaustivo de la muerte de ramas productivas en duraznero y nectarinos en la región sur del Uruguay, con énfasis en la enfermedad denominada viruela de la púa. Particularmente se observaron y describieron detalladamente los síntomas que aparecen asociados a la muerte de ramas productivas en plantaciones comerciales de durazneros y nectarinos, y se identificaron los agentes asociados mediante el uso de herramientas moleculares.

Con respecto a los síntomas, se encontró que la mayoría de los montes visitados presentaban anomalías en las ramas del año. Estas anomalías, en su mayoría, coincidieron con la sintomatología descrita en la bibliografía para viruela de la púa (Oawa et al. 1995, Uddin et al. 1997, Lalancette et al. 2003). Éstas consisten en el síntoma típico de hoja bandera en diferentes grados de avance, con la consecuente muerte de la rama, la presencia de una yema no brotada generalmente en la parte basal de la rama, rodeada de un cancro blanquecino.

También se observó, aunque con mucho menos frecuencia, muerte de ramas con presencia de yemas no brotadas rodeadas por canchros de un tono amarronado. Estos síntomas no aparecen descritos en la bibliografía como asociados a viruela de la púa. Sin embargo, también fueron colectadas ramas con estas características a los efectos de conocer si especies del género *Phomopsis* también pueden causar estos síntomas en las condiciones de producción del sur del Uruguay o, de lo contrario, quienes son los agentes asociados a la muerte de estas ramas productivas.

La cámara húmeda indujo la producción de cirros de esporas exudando de los picnidios presentes en las muestras afectadas. La mayoría de las colonias obtenidas provinieron de cirros de color blanquecino que se formaron en ramas con síntomas típicos de viruela de la púa en diferentes grados de avance. Estas colonias presentan las características del género *Phomopsis*, micelio de color blanco con ondas de crecimiento de forma lobulada. Asimismo, mediante exposición de las colonias aisladas a ciclos alternos de luz ultravioleta cercana y oscuridad se indujo la formación de picnidios. En estos picnidios fue posible observar los alfa y beta conidios característicos de *Phomopsis* spp.

En tres de las ramas que no presentaban los síntomas típicos de viruela de la púa, se desarrollaron cirros de color anaranjado. Estos cirros contenían conidios unicelulares e, hialinos pero de forma curvada. Asimismo, dieron lugar a la formación de colonias de color verde oliva a negro.

El análisis filogenético de la región ITS permitió identificar a nivel de especie de manera confiable a la mayoría de los aislados. La mayoría de los aislados que por sus características morfológicas y culturales habían sido identificados como correspondientes al género *Phomopsis* (44 aislados), pertenecen a la especie *P. amygdali*. Esta especie ha sido descrita en la bibliografía como el más común agente causal de la viruela de la púa (Oawa et al. 1995, Uddin 1997, Kanematsu et al. 1999, Lalancette y Polk 2000). Los dos aislados restantes pertenecientes a este género, fueron identificados uno como *Diaporthe infecunda* (P3) y el otro no pudo ser identificado a nivel de especie (P4). La especie *D. infecunda* fue descrita en el año 2013 por Gomes et al. (2013) a partir de aislados obtenidos de *Schinus terebinthifolius* y *Maytenus ilicifolia*. Este trabajo representa la primera mención a esta especie afectando a nectarino.

Los tres aislados restantes, provenientes de muestras con síntomas atípicos con cirros de color anaranjado (aislados P16, P20, P29) fueron identificados como pertenecientes al género *Valsa*. En este caso el análisis de la región ITS no fue suficiente para identificar a estos aislados a nivel de especie. Especies del género *Valsa* han sido citadas como patógenos de más de 70 especies de arbustos, árboles frutales (como por ejemplo duraznero y otros frutales de carozo, manzano y peral), árboles de sombra (sauce y álamo negro) y forestales de madera dura. Se trata de un organismo saprófito que vive sobre la corteza de los árboles y que puede parasitarlo cuando el árbol se debilita. La infección de pequeñas ramas da como resultado su muerte descendente sin que aparezcan canchros definidos, que ocurren en troncos y ramas grandes. Al principio el canchro produce una muerte circular gradual en la corteza de un vástago o tallo. Esta zona posteriormente se empardece y se hunde. En los frutales de carozo la corteza interna enferma, se oscurece y muestra, en ocasiones, flujos de exudados gomosos. Sobre la corteza muerta el hongo produce pequeños picnidios y más tarde la corteza puede desprenderse exponiendo el tejido leñoso. Los canchros pueden aumentar de tamaño cada año (Agrios, 2005). Los síntomas presentes en las ramas de donde se obtuvieron estos aislados, coinciden a los descritos por Ogawa et al. (1995), Agrios (2005), Biggs y Grove (2005).

En base a este trabajo se concluye que los síntomas que causa la viruela de la púa en durazneros y nectarinos en el sur del Uruguay, coinciden con los descritos en la bibliografía (Oawa 1995, Uddin 1997, Kanematsu et al. 1999, Lalancette y Polk, 2000). Asimismo, al igual que en otras regiones del mundo, la especie *P. amygdali* es el principal agente causal de esta enfermedad en nuestro país, aunque también otras especies de *Phomopsis* pueden causarla.

Por otra parte, en durazneros y nectarinos especies de *Valsa* pueden ocasionar muerte de ramas productivas al igual que especies de *Phomopsis*.

6. CONCLUSIONES

En la Región sur del Uruguay la principal enfermedad que causa muerte de ramas productivas en los cultivos de durazneros y nectarinos, es la viruela de la púa ocasionada por *Phomopsis amygdali* y en menor medida por otras especies de este género.

La sintomatología observada en el campo asociada a *Phomopsis* spp., coincide con la descrita en la bibliografía; hoja bandera en diferentes grados de avance, con la consecuente muerte de la rama y la presencia de una yema no brotada generalmente en la parte basal de la rama, rodeada de un cancro blanquecino.

Con menor importancia relativa, especies del género *Valsa* también provocan la muerte de ramas productivas en durazneros y nectarinos, ocasionando síntomas que podrían ser confundidos con los de viruela de la púa.

El análisis de la región ITS mostró ser suficiente a la hora de identificar *Phomopsis amygdali* y *Diaporthe infecunda*. Sin embargo otras especies del género *Phomopsis* y especies del género *Valsa* no pudieron ser identificadas por lo que se deberá recurrir al análisis de otras regiones génicas.

7. RESUMEN

El duraznero ocupa el primer lugar en importancia social dentro de la fruticultura de hoja caduca en Uruguay. A su vez, el duraznero y el nectarino se ubican en segundo y en séptimo lugar en cuanto a importancia productiva. Actualmente una de las principales limitantes sanitarias de estos cultivos es la muerte de ramas productivas. La principal causa de la muerte de estas ramas, es la ocurrencia de la “viruela de la púa”. Esta enfermedad es ocasionada hongos del género *Phomopsis*, pero se desconoce que especies están presentes en Uruguay. En este trabajo se realizó una prospección exhaustiva en montes de duraznero y nectarinos en el sur del país, se observaron y describieron detalladamente los síntomas asociados a muerte de ramas productivas, se colectaron muestras y se generó una colección de aislados monospóricos a partir de cirros. Finalmente los aislados fueron identificados molecularmente. Los resultados confirman que la viruela de la púa es la principal causante de muerte de ramas productivas, generando los síntomas típicos descritos en la bibliografía. *Phomopsis amygdali* es la especie predominante (90,2% de los aislados) y en menor medida otras especies de este género (3,9%). Con menor importancia, especies del género *Valsa* (5,98%) también provocan la muerte de ramas productivas, ocasionando síntomas que podrían ser confundidos con los de viruela de la púa.

Palabras clave: Duraznero; Nectarino; Viruela de la púa; Muerte de ramas productivas; Cancro blanquecino; Cirro; *Phomopsis*; *Phomopsis amygdali*.

8. SUMMARY

Peach is the main culture in terms of social relevance in deciduous Uruguayan fruticulture. Thus, peach and nectarine are second and seventh cultures when talking about production rates. Nowadays, one of the key health limitations is the death of productive branches. The main cause of these branches death is the disease known as constriction canker. The disease is caused by fungi of the *Phomopsis* genera, but it is not known which species are present in Uruguay. In this study, a comprehensive prospection of peach and nectarine orchards was conducted. Symptoms of productive branches were observed and described in detail, and a collection of monosporic isolates was developed from cirri growing on the field samples. Finally, the isolates were identified by molecular technics. The results have shown that constriction canker is the main cause of productive branches death, generating typical symptoms as the ones described in previous bibliography. *Phomopsis amygdali* is the prevailing species (90,2% of isolates) and to a lesser extent other species of this genera (3,9%). Less outstandingly, species of *Valsa* (5,98%) also cause death of productive branches, generating symptoms that could be confused with those from constriction canker.

Keywords: Peach; Nectarine; Constriction canker; Death of productive branches; Whitish canker; Cirrus; *Phomopsis*; *Phomopsis amygdali*.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. 2005. Plant pathology. 5th. ed. San Diego, California, Elsevier. 948 p.
2. _____. 2008. Fitopatología. 2a. ed. México, Limusa. 838 p.
3. Benson, D.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.; Ostell, J.; Sayers, E. 2011. GenBank. Nucleic Acids Research. 39 (Supl. 1): D32-D37.
4. Biggs, A.; Grove, G. 2005. Leucostoma canker of stone fruits. (en línea). The Plant Health Instructor 2005: s.p. Consultado oct. 2015. Disponible en <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/LeucostomaCanker.aspx>
5. Delgado, L., 2013. Caracterización de especies de Botryosphaeriaceae asociadas al cultivo de manzano en Uruguay. Maestría en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. PEDECIBA-Biología. 78 p.
6. Farr, D.; Castlebury L.; Rossman, A. 2002. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. Mycología. 94 (3): 494-504.
7. Fernández Valiela, M. 1978. Introducción a la fitopatología. 3^a. ed. Buenos Aires, INTA. v.3, 779 p.
8. Gao, Y.; Su, Y.; Sun, W.; Cai, L. 2015. Diaporthe species occurring on *Lithocarpus glabra* in China, with descriptions of five new species. Fungal Biology. 119 (5): 295–309.
9. Garibaldi, A.; Bertetti, D.; Poli, A.; Gullino, M. 2011. First report of Black Rot caused by *Phomopsis cucurbitae* on Cantaloupe (*Cucumis melo*) in the Piedmont Region of Northern Italy. Plant Disease. 95 (10):1317.

10. Gomes, R.; Glienke, C.; Videira S.; Lombard, L.; Groenewald, J.; Crous, P. 2013. Diaporthe; a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*. 31: 1–41.
11. Kanematsu, S.; Yokoyama Y.; Kobayashi T.; Kudo. A.; Ohtsu, Y. 1999. Taxonomic reassessment of the causal fungus of peach fusicoccum canker in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 25: 11-19.
12. Lalancette, N.; Polk, D. 2000. Estimating yield and economic loss from constriction canker of peach. *Plant Disease*. 84(9):941-946.
13. _____; Robison, D. 2001. Seasonal availability of inoculum for constriction canker of peach in New Jersey. *Phytopathology*. 91(11):1109-1115.
14. _____; _____. 2002. Effect of fungicides, application timing, and canker removal on incidence and severity of constriction canker of peach. *Phytopathology*. 86(7):721-728.
15. _____; Foster, K.; Robison, D. 2003. Quantitative models for describing temperature and moisture effects on sporulation of *Phomopsis amygdali* on peach. *Phytopathology*. 93(9):1165-1172.
16. Malvarez, G.; Rodríguez, A.; Aguilar, C.; Silveira, A.C.; Silvera, E.; Burgueño, J.; Mondino, P. 2004. *Monilinia fructicola*, única especie ocasionando la podredumbre morena del duraznero (*Prunus pérsica*) en Uruguay. *Fitopatología*. 39:126-132.
17. MAP. DGSA (Ministerio de Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Agronómicos, UY). 1981. Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saprófitas en el Uruguay. Montevideo. 140 p. (Informe técnico no. 9).
18. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, UY). 2013. Anuario estadístico agropecuario. Montevideo. 270 p.
19. _____. _____. 2014. Encuesta frutícola de hoja caduca. Montevideo. 28 p.

20. _____ . _____ . 2015. Encuesta frutícola de hoja caduca. Montevideo. 25 p.
21. Moleleki N.; Preisig, O.; Wingfield, N.; Willem, P.; Wingfield, B. 2002. PCR-RFLP and sequence data delineate three *Diaporthe* species associated with stone and pome fruit trees in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*. 108 (9): 909-912.
22. Mondino, P.; Alaniz, S.; Leoni, C. 2010. Manejo integrado de las enfermedades en duraznero en Uruguay. *In*: Soria, J. ed. Manual del duraznero; manejo integrado de plagas y enfermedades. Montevideo, INIA. pp. 45-76 (Boletín de Divulgación no. 99).
23. _____ . 2014. Sintomatología, etiología y características epidemiológicas de la enfermedad. *In*: Mitidieri, M.; Castillo, J. eds. Manejo de la Podredumbre morena (*Monilinia fructicola* y *M. laxa*) y en huertos frutales de Uruguay, Chile, Bolivia, Brasil y Argentina. s.n.t. pp. 35-41.
24. Ogawa, J.; Zehr, E.; Bird, G.; Ritchie, D.; Uriu, K.; Uyemoto, J. 1995. Compendium of stone fruit diseases. St. Paul, MN, American Phytopathological Society. 98 p.
25. Palocci, F.; Rubini, A.; Granetti, B.; Arcioni, S. 1999. Rapid molecular approach for reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. *Fems Microbiology Ecology*. 28 (1):23-30.
26. Peever, T.; Canilhos, Y; Olsen, L.; Ibañez, A.; Liu, Y.; Timmer, L. 1999. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing Brown Spot of Minneola Tangelo and Rough Lemon in Florida. *Phytopathology*. 89 (10):851-860.
27. Pegg, D. 2007. Principles of cryopreservation. *In*: Day, J.; Stacy, G. eds. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey, Humana Press. pp. 39-57.
28. Rolshausen, P.; Trouillas, F.; Gubler, W. 2004. Identification of *Eutypa lata* by PCR-RFLP. *Phytopathology*. 88 (9): 925-929.
29. Rossman, A.; Farr, D.; Castlebury, L. 2007. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience*. 48: 135-144.

30. Schnabel, G.; Lalancette, N. s.f. Constriction canker (*Phomopsis* twig blight) management in peach. (en línea). Clemson, South Carolina, Clemson University Cooperative Extension Center. 5 p. Consultado oct. 2015. Disponible en https://www.clemson.edu/extension/horticulture/fruit_vegetable/peach/diseases/pdf/phomopsis.pdf.
31. Shirahatti, P.; Ramu, R.; Adkar R.; Nagendra, M. 2015. Development of a simple and reliable species-specific detection of *Phomopsis azadirachtae*, using the translation elongation factor 1-alpha gene. *European Journal of Plant Pathology*. 141 (4): 769-778.
32. Shishido, M.; Sato, K.; Yoshida, N. 2010. PCR-based assays to detect and quantify *Phomopsis sclerotioides* in plants and soil. *Fungal Diseases*. 76(1): 21-30.
33. Soria, J. 2004. La evaluación de variedades de durazneros y nectarinas en “Las Brujas” In: Seminario de Actualización Técnica en el Cultivo del Duraznero (2004, Rincón del Colorado, Canelones). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 10-18 (Actividades de Difusión no. 381).
34. _____; Pisano, J. 2014. Variedades de duraznero y nectarina para el Uruguay. In: Soria, J.ed. Manual del duraznero; la planta y la cosecha. Montevideo, INIA. pp. 85-158 (Boletín de Divulgación no. 108).
35. Squire, G.; Mansfield, T. 1974. The action of fusicoccin on stomatal guard cells and subsidiary cells. *New Phytologist*. 73(3): 433–440.
36. Stewart, S. 2015. Caracterización del agente causal del cancro del tallo de la soja en Uruguay. *Agrociencia* (Montevideo). 19 (1): 69-76.
37. Tuset, J.; Portilla, M. 2011. Taxonomic status of *Fusicoccum amygdali* and *Phomopsis amygdalina*. *Canadian Journal of Botany*. 67(5):1275-1280.
38. Turner, N.; Graniti, A. 1969. Fusicoccin; a fungal toxin that opens stomata. *Nature*. 223(5210): 1070–1071.

39. Udayanga, D.; Liu, X.; Crous, P.; McKenzie, E.; Chukeatirote, E.; Hyde K. 2012. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity*. 56 (1) 157-171.
40. Uddin, W.; Stevenson, K.; Pardo-Schultheiss, A. 1997. Pathogenicity of a species of *Phomopsis* causing a shoot blight on peach in Georgia and evaluation of possible infection courts. *Plant Disease*. 81(9):983-989.
41. _____; _____. 1998. Seasonal development of *Phomopsis* shoot blight of peach and effects of selective pruning and shoot debris management on disease incidence. *Plant Disease*. 82 (5):565 – 568.
42. Van Niekerk, J.; Groenewald, J.; Farr, D.; Fourie, P.; Halleen, F.; Crous, P. 2005. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. *Australasian Plant Pathology*. 34: 27-39.
43. Vedashree, S.; Sateesh, M.; Chowdappa, P.; Nirmalkumar, B. 2015. Species-Specific PCR-Based assay for identification and detection of *Phomopsis (Diaporthe) azadirachtae* causing die-back disease in *Azadirachta indica*. *Journal of Phytopathology*. 163(10):818-828.
44. White, T.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: Innis, M.; Gelfand, D.; Sninsky, J.; White, T. eds. *PCR protocols; a guide to methods and applications*. San Diego, California, Academic Press. pp. 315-322.