

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS DE *Monilinia* spp. Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD SOBRE MANZANA

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Monilinia* sp. ISOLATES AND PATHOGENICITY ON APPLE

Zaida Muñoz, Assumpció Moret y Joan Bech

Universitat de Barcelona, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología. Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona (mmoret@ub.edu)

RESUMEN

La podredumbre morena o momificada de los frutos producida por *Monilinia* spp. ocasiona importantes pérdidas de producción en especies de rosáceas. Se han identificado tres especies de *Monilinia* muy relacionadas entre sí: *M. laxa* y *M. fructigena* de origen europeo, y *M. fructicola* de origen americano. En 2006 la Organización Nacional de Protección de las Plantas de España confirmó la presencia de *M. fructicola* en dos localidades de Cataluña. Para determinar la posible expansión de esta especie de cuarentena en nuestro país se han caracterizado morfológica y molecularmente 28 aislamientos de *Monilinia* spp. procedentes de diversas localidades catalanas y del resto de España. La caracterización morfológica se hizo mediante cultivo de los aislados en medio patata dextrosa agar y determinación de ciertos caracteres a los 4 y 7 d de incubación. Las variables fueron la coloración de la colonia, la forma de los márgenes y la presencia de masas estromáticas; además se caracterizaron molecularmente mediante PCR múltiple con iniciadores específicos para las tres especies. Para estudiar la patogenicidad de aislados de dichas especies se infectaron artificialmente manzanas de la variedad Golden Delicious y a las 72 h y 96 h se determinó el diámetro de las lesiones y se evaluó la presencia de esporulación. Un 20% de los aislados se caracterizaron como *M. fructigena* y 80% como *M. laxa*. Los aislados de *M. fructigena* fueron significativamente más agresivos que los de *M. laxa* 96 h después de la inoculación. Se concluye que los focos de infección de *M. fructicola* en España han sido puntuales y limitados y no se observa una expansión de la enfermedad en las localidades estudiadas.

Palabras clave: *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, *Pyrus malus*, patogenicidad, PCR múltiple.

INTRODUCCIÓN

La podredumbre morena o momificada de los frutos producida por *Monilinia* spp. ocasiona importantes pérdidas de producción en especies de rosáceas (*Prunus* spp., manzano [*Pyrus malus* L.] y peral [*Pyrus communis* L.]). Se han identificado

Recibido: Diciembre, 2006. Aprobado: Octubre, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 119-128. 2008.

ABSTRACT

Brown rot, or mummified fruit disease produced by *Monilinia* sp., causes major losses in production of species of the Rosaceae family. Three closely related species of *Monilinia* have been identified: *M. laxa* and *M. fructigena*, of European origin, and *M. fructicola*, of American origin. In 2006 the Organización Nacional de Protección de las Plantas of Spain confirmed the presence of *M. fructicola* in two locations of Catalonia. To determine the possible spread of this species, which is subject to quarantine in Spain, 28 isolates of *Monilinia* sp. from different locations of Catalonia and the rest of the country were characterized morphologically and molecularly. Morphological characterization was performed by culturing the isolates in a potato dextrose agar medium, and given traits were determined after 4 and 7 d of incubation. The variables were coloring of the colony, shape of the edges and presence of stromatic masses. Isolates were also characterized molecularly using multiplex PCR with specific primers for the three species. To study pathogenicity of the isolates of both species, Golden Delicious apples were infected artificially; 72 and 96 h later diameter of the lesions was measured and sporulation was assessed. Of the isolates, 20% were identified as *M. fructigena* and 80% were *M. laxa*. The isolates of *M. fructigena* were significantly more aggressive than those of *M. laxa* 96 h after inoculation. It is concluded that centers of infection of *M. fructicola* in Spain have been pin-pointed and confined, and spread of brown rot is not observed in the locations studied.

Key words: *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, *Pyrus malus*, pathogenicity, multiplex PCR.

INTRODUCTION

Brown rot, or mummified fruit, produced by *Monilinia* sp., causes major losses in the production of Rosaceae family species (*Prunus* sp., apple [*Pyrus malus* L.], and pear [*Pyrus communis* L.]). Three species of closely related *Monilinia* have been identified: *M. laxa* (Aderhold & Ruhland) Honey, *M. fructigena* (Aderhold & Ruhland) Honey, and *M. fructicola* (Winter) Honey, and an anamorph of *Monilinia*, *Monilia polystrom* van Leeuwen. In 2006

tres especies de *Monilinia* muy relacionadas entre sí: *M. laxa* (Aderhold & Ruhland) Honey, *M. fructigena* (Aderhold & Ruhland) Honey y *M. fructicola* (Winter) Honey y un anamorfo de *Monilinia*, *Monilia polystroma* van Leeuwen. En 2006 la Organización Nacional de Protección de las Plantas (NPPO) de España confirmó la presencia de *M. fructicola* en dos localidades de Cataluña. Los principales hospederos de *M. fructicola* son melocotón (*Prunus persica* [L.] Batsch), nectarina (*Prunus persica* var. *nectarina* [Aiton] Maxim.), albaricque (*Prunus armeniaca* L.) y ciruela (*Prunus domestica* L.); *M. fructigena* es más frecuente en manzanas (*Pyrus malus* L.), peras (*Pyrus communis* L.) y cerezas (*Prunus avium* L.) (Batra, 1991); *M. laxa* prefiere albaricokes, almendros (*Prunus dulcis* [Mill.] D.A. Webb) y cerezos; y *M. polystroma* infecta manzano, peral y membrillo (*Cydonia oblonga* Mill.). *M. laxa* afecta preferentemente flores y ramillas mientras que *M. fructigena* tiene mayor incidencia en frutos (Byrde y Willetts, 1977). *M. fructicola* es un patógeno de frutales de hueso capaz de atacar flores, frutos y ramillas (Ogawa y English, 1960).

Es difícil identificar dichas especies con base en las características morfológicas de los aislamientos en medios de cultivo y en la tasa de crecimiento micelial, porque su aspecto morfológico puede variar entre los aislados de una misma especie. Los métodos de biología molecular son la principal herramienta para identificar dichas especies (Hughes *et al.*, 2000). Se ha utilizado RAPD (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), AFLP (Majer *et al.*, 1996), amplificación de la región ITS y digestión posterior con enzimas de restricción (Snyder y Jones, 1999; Förster y Adaskaveg, 2000) y otros tipos de marcadores moleculares. Basándose en pequeñas variaciones intraespecíficas y un bajo polimorfismo interespecífico en la región ITS, Ioos y Frey (2000) desarrollaron parejas de iniciadores específicos para cada especie. Se diseñaron iniciadores específicos para *M. fructicola* (Fulton y Brown, 1997; Förster y Adaskaveg, 2000; Boehm *et al.*, 2001) que permiten amplificar aislamientos de esta especie aunque no los de *M. fructigena* y *M. laxa*. Fulton y Brown (1997) identificaron un intrón del grupo-I en la SSU del rDNA de *M. fructicola* el cual no está presente en *M. fructigena* y *M. laxa*. Sin embargo, Côté *et al.* (2004a) observaron que el producto de la PCR que contiene el intrón no se amplifica en algunos aislados de *M. fructicola*, lo cual indica variabilidad genética entre los aislados de dicha especie. Se han desarrollado iniciadores que permiten la diferenciación inequívoca de *M. laxa*, *M. fructigena* y *M. fructicola* en una única reacción de PCR (Malvárez *et al.*, 2001; Côté *et al.*, 2004b), lo cual agiliza la detección de estas especies.

the National Organization for Plant Protection (Organización Nacional de Protección de las Plantas-NPPO) of Spain confirmed the presence of *M. fructicola* at two sites of Catalonia. The main hosts of *M. fructicola* are peach (*Prunus persica* [L.] Batsch), nectarine (*Prunus persica* var. *nectarina* [Aiton] Maxim.), apricot (*Prunus armeniaca* L.) and plum (*Prunus domestica* L.); *M. fructigena* is more frequent in apple (*Pyrus malus* L.), pear (*Pyrus communis* L.) and cherries (*Pyrus avium* L.) (Batra, 1991); *M. laxa* prefers apricots, almonds (*Prunus dulcis* [Mill.] D.A. Webb) and cherries; while *M. polystroma* infects apple, pear and quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *M. laxa* more easily affects flowers and stems, while *M. fructigena* has a higher incidence in fruits (Byrde and Willetts, 1977). *M. fructicola* is a pathogen of stone fruits that is capable of attacking flowers, fruits and stems (Ogawa and English, 1960).

It is difficult to identify these species based on morphological characteristics of the isolates in culture medium and mycelial growth rate because their appearance can vary among isolates of a single species. The methods of molecular biology are the principal tools for identification of these species (Hughes *et al.*, 2000). These methods include RAPD (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), AFLP (Majer *et al.*, 1996), ITS region amplification with later restriction enzyme digestion (Snyder and Jones, 1999; Förster and Adaskaveg, 2000) and some other types of molecular markers. Based on small intraspecies variations and a low interspecies polymorphism in the ITS region, Ioos and Frey (2000) developed specific primer pairs for each species. Specific primers were designed for *M. fructicola* (Fulton and Brown, 1997; Förster and Adaskaveg, 2000; Boehm *et al.*, 2001) that allow amplification of its isolates, though not of isolates of *M. fructigena* and *M. laxa*. Fulton and Brown (1997) identified a group I intron in SSU rDNA of *M. fructicola*, which is not present in *M. fructigena* and *M. laxa*. However, Côté *et al.* (2004a) observed that the PCR product containing the intron does not amplify in some isolates of *M. fructicola*, which indicates genetic variability among the isolates of this species. Primers have been developed that allow clear differentiation of *M. laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola* in a single PCR reaction (Malvárez *et al.*, 2001; Côté *et al.*, 2004b); this expedites detection of these species.

The objectives of this study were to characterize, morphologically and molecularly, isolates of *Monilinia* sp. obtained from peach, cherry, apple and quince fruits using multiplex PCR with specific primers and to determine their aggressiveness by inoculating Golden Delicious apple *in vitro*.

Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar morfológica y molecularmente mediante PCR múltiple con iniciadores específicos aislamientos de *Monilinia* spp. obtenidos de frutos de melocotón, cereza, manzana y membrillo, y determinar su agresividad mediante la inoculación *in vitro* de manzanas de la variedad Golden Delicious.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados

Los aislados de *Monilinia* spp. se hicieron con frutos infectados procedentes de nueve localidades catalanas y cuatro del resto de España (Cuadro 1). El medio de cultivo usado para los primeros aislamientos fue agar glucosado con cloranfenicol (Saboraud Dextrose Agar CAF 500 [45 g L⁻¹], Biolife). Luego se sembraron discos (5 mm diámetro) obtenidos del margen de las colonias sobre patata dextrosa agar (PDA [39 g L⁻¹], Sigma, Aldrich) y las placas se incubaron a 23±1 °C con 12 h de oscuridad y 12 h de iluminación con luz fluorescente. A los 4 y 7 d de crecimiento en PDA se calculó

MATERIALS AND METHODS

Isolates

Monilinia sp. isolates were obtained from infected fruits from nine sites in Catalonia and from four sites in other parts of Spain (Table 1). The culture medium used for the first isolates was glucose agar with chloramphenicol (Saboraud Dextrose Agar CAF 500 [45 g L⁻¹], Biolife). Discs (5 mm diameter) obtained from the edge of colonies growing on potato dextrose agar (PDA) [39 g L⁻¹], Sigma, Aldrich) were then re-sown and incubated at 23±1 °C with 12 h of darkness and 12 h of fluorescent light. On the 4th and 7th d in PDA growth of each colony was calculated as the mean of three diameters drawn on the reverse of the capsules. On the 15th d of incubation morphological characteristics were determined: color of the colony, shape of the edges, presence of stromata, and formation of growth rings. The isolates were stored at -20 °C.

DNA extraction

DNA was extracted using the nucleic acid E.Z.N.A.® Fungal DNA Kit (Omega-Bio-Tek). The DNA of each sample was kept at -20 °C until use.

Cuadro 1. Aislados de *Monilinia* spp., especie identificada, planta hospedante afectada, procedencia de la muestra, fecha de aislamiento y producto de PCR.

Table 1. Isolates of *Monilinia* sp., species identified, affected host plant, origin of the sample, date of isolation, and PCR product.

Aislado	Especie	Planta hospedante	Procedencia	Fecha aislamiento	Producto de PCR (pb)
M01	<i>M. fructigena</i>	<i>Pyrus malus</i>	Almería [§]	06/10/05	402
M02	<i>M. fructigena</i>	<i>Pyrus malus</i>	La Nou, BCN ^{†‡}	06/10/05	402
M03	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus persica</i>	Viladecavalls, BCN [†]	06/10/05	333
M04	<i>M. fructigena</i>	<i>Pyrus malus</i>	St. Pere P. Girona [†]	04/11/05	402
M05	<i>M. fructigena</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	Blanes, Girona [†]	04/11/05	402
M06	<i>M. fructigena</i>	<i>Pyrus malus</i>	Riumors, Girona [†]	08/11/05	402
M07	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Calasparra, Murcia [§]	12/05/06	333
M08	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Fraga, Huesca [§]	17/05/06	333
M09	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Fraga, Huesca [§]	17/05/06	333
M10	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Fraga, Huesca [§]	17/05/06	333
M11	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Fraga, Huesca [§]	17/05/06	333
M12	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Fraga, Huesca [§]	17/05/06	333
M13	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Fraga, Huesca [§]	18/05/06	333
M14	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Fraga, Huesca [§]	18/05/06	333
M15	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Fraga, Huesca [§]	18/05/06	333
M16	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Tarragona [†]	21/05/06	333
M17	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Tarragona [†]	21/05/06	333
M18	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Murcia [§]	30/05/06	333
M19	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Murcia [§]	30/05/06	333
M20	<i>M. fructigena</i>	<i>Prunus avium</i>	Murcia [§]	30/05/06	402
M23	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Vilafranca, BCN [†]	12/06/06	333
M24	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Vilafranca, BCN [†]	14/06/06	333
M25	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Els Monjos, BCN [†]	22/06/06	333
M27	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus avium</i>	Tordera, BCN [†]	28/06/06	333
M28	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>	Calasparra, Murcia [§]	29/06/06	333
M29	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus persica</i>	Calasparra, Murcia [§]	29/06/06	333
M30	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus persica</i>	Calasparra, Murcia [§]	29/06/06	333
M31	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>	Calasparra, Murcia [§]	29/06/06	333

[†] BCN = Barcelona.

[‡] Localidades catalanas.

[§] Localidades del resto de España.

el crecimiento de cada colonia con la media de tres diámetros trazados en el reverso de las cápsulas. A los 15 d de incubación se determinaron características morfológicas: coloración de la colonia, forma de los márgenes, presencia de estromas, y formación de anillos de crecimiento. Los aislados se conservaron a -20 °C.

Extracción del ADN

Se usó el kit de aislamiento de ácidos nucleicos E.Z.N.A.® Fungal DNA Kit (Omega-Bio-Tek). El ADN de cada muestra se mantuvo congelado a -20 °C hasta su utilización.

Amplificación del ADN mediante PCR múltiple

Para determinar la especie responsable de la infección se hizo una PCR múltiple, según el protocolo de Malvárez *et al.* (2001), usando iniciadores específicos para *M. fructigena* (M0368-8R), *M. fructicola* (M0368-10R) y *M. laxa* combinados con un iniciador común a las tres especies (M0368-5). El iniciador específico para *M. fructigena* también permite amplificar *M. polystroma* (Côté *et al.*, 2004b) (Cuadro 2).

Pruebas de patogenicidad de *Monilinia* spp. sobre manzana

Para la inoculación artificial de frutos sanos de manzana (Golden Delicious) se hizo una desinfección superficial sumergiéndolos 5 min en una solución de hipoclorito sódico al 1% (vol: vol) y dos lavados consecutivos con agua destilada estéril. Se hizo uno o dos orificios (5 mm diámetro; 4 mm profundidad) en cada manzana donde se introdujo el inóculo procedente de un cultivo puro de *Monilinia* spp. de 6 d de crecimiento. Se escogieron 10 aislamientos para las inoculaciones: siete de *M. laxa* (M07, M10, M17, M18, M23, M25, M27) y tres de *M. fructigena* (M01, M05 y M20); se inocularon cuatro frutos por aislamiento y cuatro como testigo. Los frutos testigo recibieron sólo un disco de PDA estéril y las pruebas de patogenicidad se repitieron dos veces.

El material inoculado se incubó en cámara húmeda a 22 °C y con el régimen de luz citado. A las 72 y 96 h siguientes a la inoculación se calculó el diámetro de las lesiones y se observaron los síntomas de las áreas afectadas, así como la formación de micelio y el desarrollo de masas estromáticas. De los frutos inoculados se hicieron aislamientos que se incubaron a 23 °C para confirmar los Postulados de Koch (Schiffman *et al.*, 1985).

DNA amplification with multiplex PCR

To determine the species responsible for the infection, a multiplex PCR was performed, following the protocol of Malvárez *et al.* (2001) and using the specific primers for *M. fructigena* (M0368-8R), *M. fructicola* (M0368-10R) and *M. laxa* combined with a primer common to the three species (M0368-5). The specific primer for *M. fructigena* also allowed amplification of *M. polystroma* (Côté *et al.*, 2004b) (Table 2).

Pathogenicity test of *Monilinia* sp. on apple

For artificial inoculation of healthy apple fruits (Golden Delicious), fruit surface was disinfected by submerging them 5 min in a solution of 1% sodium hypochlorite (vol:vol) and washing twice consecutively with sterile distilled water. One or two holes (5 mm diameter; 4 mm deep) were made in each apple where inoculum from a pure 6 day-old culture of *Monilinia* sp. was introduced. Ten isolates were selected for inoculation: seven *M. laxa* (M07, M10, M17, M18, M23, M25, M27) and three *M. fructigena* (M01, M05 and M20). Four fruits per isolate were inoculated and four fruits were used as control. The control fruits received only a sterile PDA disc and the pathogenicity tests were replicated twice.

Inoculated material was incubated in a humid chamber at 22 °C and the light regime mentioned above. Seventy-two and 96 h after inoculation, diameter of the lesions was calculated and symptoms were observed in the affected areas, as well as mycelial formation and development of stromatic masses. Isolates of the fungus growing on the inoculated fruits were obtained and incubated at 23 °C to confirm Koch's Postulates (Schiffman *et al.*, 1985).

Statistics

The differences among mean diameters of the colonies of the *Monilinia* sp. isolates were evaluated with an analysis of variance on d 4 and 7 of incubation. Diameter means were compared with the LSD test (p≤0.05). Pathogenicity of selected isolates on apples was evaluated comparing diameters at 72 and 96 h using an analysis of variance; Tukey test (p≤0.05) was used to compare means among treatments.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la determinación específica de los aislados de *Monilinia* spp.

Table 2. Primers used for specific determination of *Monilinia* sp. isolates.

Iniciador	secuencia 3'-5'	Especie	Referencia
MO368-8R	AGATCAAACATCGTCCATCT	<i>M. fructigena</i> y <i>M. polystroma</i>	Malvárez, G. 2001/Côté <i>et al.</i> , 2004b
MO368-10R	AAGATTGTCACCATGGTTGA	<i>M. fructicola</i>	Malvárez, G. 2001/Côté <i>et al.</i> , 2004b
MO368-12	GACTGCAATCCACACCGTCG	<i>M. laxa</i>	Malvárez, G. 2001
MO368-5	GCAAGGTGTCAAAACTTCCA	Iniciador común	Malvárez, G. 2001/Côté <i>et al.</i> , 2004b

Estadística

La diferencia entre los diámetros medios de las colonias de los aislados de *Monilinia* spp. se evaluó mediante análisis de la varianza a los 4 y 7 d de incubación. La prueba de la DMS ($p \leq 0.05$) se usó para comparar las medias entre los diámetros. La patogenicidad de los aislados seleccionados sobre manzanas se evaluó comparando los diámetros a las 72 y 96 h con un análisis de varianza; las medias entre los diámetros se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Diámetro de crecimiento de las colonias y características morfológicas de los aislamientos

La media del crecimiento de las colonias calculada usando la media de tres diámetros a los 4 y 7 d de incubación se presenta en el Cuadro 3. El diámetro de

RESULTS

Growth diameter of the colonies and morphological characteristics of the isolates

Mean growth of the colonies calculated using the average of three diameters on the 4th and 7th d of incubation is shown in Table 3. Growth diameter of the colonies of isolates of *M. fructigena* varied from 41.98 ± 0.40 mm to 46.21 ± 0.85 mm on d 4 of incubation, while on d 7 growth oscillated between 68.60 ± 0.70 mm and 78.33 ± 0.78 mm. *M. laxa* grew slightly less than *M. fructigena*. On d 4 of incubation, minimum and maximum diameters were 17.67 ± 0.41 mm and 59.0 ± 0.71 mm and on d 7 they were 47.0 ± 3.08 mm and 78.67 ± 1.08 mm.

Morphological characterization of the colonies obtained from re-seeding in PDA, after 15 d of

Cuadro 3. Diámetro de las colonias de los aislados *Monilinia* spp. en patata dextrosa agar a los 4 y 7 d de incubación y características culturales observadas a los 15 d de crecimiento en el mismo medio.

Table 3. Diameter of colonies of *Monilinia* sp. isolates in potato dextrose agar on d 4 and 7 of incubations, and cultural characteristics observed on d 15 of growth in the same medium.

Aislado	Diámetro de colonia, mm		ML [†]	ME [‡]	CC [§]	AC ^ϕ
	4 d	7 d				
M01	45.16±0.91	69.33±0.67	-	+	C	-
M02	41.976±0.40	70.133±0.47	-	+	C	-
M03	41.953±2.43	62.753±2.95	+	-	MG	+
M04	44.303±0.41	75.360±1.25	-	+	C	-
M05	42.818±0.77	72.567±0.91	+	+	C	-
M06	43.836±0.59	78.333±0.78	-	+	C	-
M07	49.000±0.71	75.333±1.78	+	-	MG	+
M08	50.333±1.47	55.000±3.24	+	-	MG	+
M09	41.000±3.08	78.667±1.08	+	-	MG	+
M10	45.000±0.71	57.333±1.63	+	-	MG	+
M11	38.667±0.41	62.667±3.89	+	-	MG	+
M12	34.667±1.78	62.667±0.82	+	-	MG	+
M13	46.333±2.68	62.333±4.14	+/-	-	MG	+
M14	58.667±0.82	72.667±0.54	+	-	MG	+
M15	47.667±0.41	65.667±1.63	+	-	MG	+
M16	36.000±2.12	55.333±2.48	+	-	MG	+
M17	44.333±1.08	74.333±2.48	+	-	MG	-
M18	47.333±0.82	68.333±1.47	+	-	MG	+
M19	45.333±1.78	73.000±3.24	+	-	MG	-
M20	46.207±0.85	68.600±0.70	+	+	C	+
M23	59.000±0.71	71.000±2.12	+	-	MG	+
M24	52.833±1.74	67.667±3.63	+/-	-	MG	-
M25	30.667±1.78	48.667±1.08	+	-	MG	+
M27	45.000±1.87	77.333±1.08	+	-	MG	+
M28	41.233±1.18	62.267±0.23	+	-	MG	+
M29	17.667±0.41	47.000±3.08	+	-	MG	-
M30	40.000±0.71	59.000±2.12	+	-	MG	+
M31	38.667±1.08	76.333±2.27	+/-	+	MG	+

[†] Márgenes lobulados. + lobulación definida; - no lobulados; +/- poco lobulados.

[‡] Masas estromáticas. + presencia de masas estromáticas; - ausencia de masas estromáticas.

[§] Coloración de la colonia. C crema; MG marrón grisáceo.

^ϕ Anillos de crecimiento. + presencia de anillos oscuros de crecimiento; - ausencia de anillos oscuros de crecimiento.

crecimiento de las colonias de los aislados de *M. fructigena* varió de 41.98 ± 0.40 mm a 46.21 ± 0.85 mm a los 4 d de incubación, mientras que a los 7 d el crecimiento osciló entre 68.60 ± 0.70 mm y 78.33 ± 0.78 mm. *M. laxa* tuvo un crecimiento ligeramente inferior a *M. fructigena*. A los 4 d de incubación los diámetros mínimo y máximo fueron 17.67 ± 0.41 mm y 59.0 ± 0.71 mm, y 47.0 ± 3.08 mm y 78.67 ± 1.08 mm a los 7 d.

La caracterización morfológica de las colonias obtenidas de las resiembras en PDA, a los 15 d de incubación, permitió diferenciar dos tipos de desarrollo micelial: 1) colonias de color marrón grisáceo, poco prominentes, con márgenes ondulados y anillos de crecimiento más oscuros, que según los estudios moleculares correspondieron a *M. laxa*; 2) colonias de color crema, crecimiento uniforme y continuo, márgenes de la colonia no lobulados y abundante micelio aéreo en correspondencia con las zonas de mayor esporulación que pertenecían a *M. fructigena*, aunque algunos de los aislados de esta especie se asemejaban a *M. laxa* por su aspecto en forma de roseta y la presencia de círculos de crecimiento. La formación de abundantes masas estromáticas en *M. fructigena* sólo se observó en un aislamiento de *M. laxa*.

No hubo diferencias significativas de crecimiento ($p > 0.05$) entre los aislados de *M. fructigena* y los de *M. laxa* a los 4 d de incubación. Sin embargo, a los 7 d el diámetro medio de los aislados de *M. fructigena* fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) que el de los aislados de *M. laxa* (Cuadro 4).

Determinación molecular de la especie mediante PCR múltiplex

Los resultados del producto de la PCR múltiplex con iniciadores específicos permitieron diferenciar dos especies de *Monilinia* con base en el tamaño de la banda: 1) seis de los 28 aislamientos tenían un tamaño de banda de 402 pb (Figura 1) que corresponde a *M. fructigena*; 2) en 22 aislamientos el tamaño de la banda fue 333 pb, correspondiente a *M. laxa* (Cuadro 1).

Pruebas de patogenicidad sobre manzana (*Pyrus malus*)

Todos los aislamientos estudiados fueron patogénicos dado que los frutos artificialmente infectados manifestaron síntomas típicos de podredumbre marrón que se observaron 24 h después de la inoculación. Se formaron lesiones pardas de tipo concéntrico alrededor de la zona inoculada que aumentaron sus dimensiones y determinaron una pudrición generalizada de la mayoría de los frutos al final del ensayo. No hubo diferencias

incubación, revealed two distinct types of mycelial development: 1) non-prominent grayish dark red colonies with undulant edges and darker growth rings, which according to molecular studies, describe *M. laxa*; 2) cream-colored colonies, uniform continuous growth, non-lobulate colony edges and abundant aerial mycelium corresponding to areas of greater sporulation, conforming to *M. fructigena*, although some of the isolates of this species were similar to *M. laxa* because of its rosette-shaped appearance and the presence of growth rings. The formation of abundant stromatic masses in *M. fructigena* was only observed in one isolate of *M. laxa*.

There were no significant differences in growth ($p > 0.05$) among the isolates of *M. fructigena* or those of *M. laxa* on d 4 of incubation. However, on d 7 the mean diameter of the *M. fructigena* isolates was significantly larger ($p \leq 0.05$) than that of the *M. laxa* isolates (Table 4).

Molecular determination of the species with multiplex PCR

The results of the multiplex PCR product with specific primers allowed differentiation of two of the *Monilinia* species on the basis of band size: 1) six of the 28 isolates had a band size of 402 pb (Figure 1), corresponding to *M. fructigena*; 2) 22 of the isolates had a band size of 333 pb, corresponding to *M. laxa* (Table 1).

Pathogenicity tests on apple (*Pyrus malus*)

All of the isolates studied were pathogenic since the artificially infected fruits exhibited typical symptoms of dark red rot that were observed 24 h after inoculation. Brown concentric lesions formed around the inoculated area and increased in dimensions, ending in generalized rotting of most of the fruits at the end of the trial.

Cuadro 4. Diámetro medio de crecimiento de *Monilinia fructigena* y *M. laxa* a los 4 y 7 d de incubación en patata dextrosa agar.

Table 4. Mean growth diameter of *Monilinia fructigena* and *M. laxa* after 4 and 7 d of incubation in potato dextrose agar.

	n [†]	Diámetro (mm)	
		4 d	7 d
<i>M. fructigena</i>	18	43.95 ± 1.24 a	72.715 ± 1.02 a
<i>M. laxa</i>	66	42.896 ± 0.88 a	64.875 ± 0.89 b

Medias con letra distinta en una hilera son estadísticamente diferentes (LSD, $p \leq 0.05$).

[†] Se calculó el crecimiento a partir de los diámetros trazados en el reverso de todas las cápsulas.

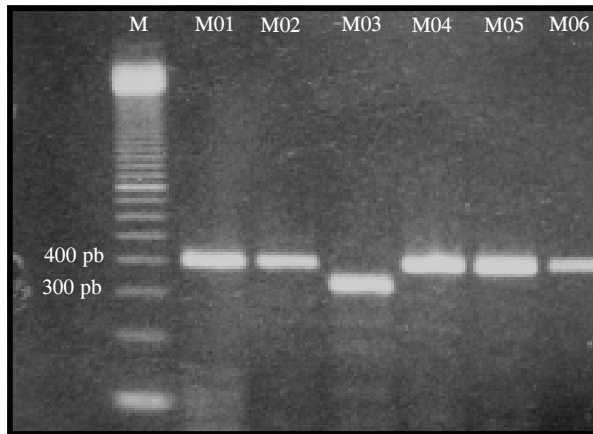


Figura 1. Producto de la PCR obtenido mediante la amplificación con iniciadores específicos de los aislados M01, M02, M03, M04, M05 y M06 de *Monilinia* spp. M: marcador de 100 pares de bases (*Amersham Biosciences*).

Figure 1. Product of PCR obtained by amplification with specific primers of isolates M01, M02, M03, M04, M05 and M06 of *Monilinia* spp. M: marker of 100 pair of basis (*Amersham Biosciences*).

de crecimiento entre los aislados después de 72 h de incubación ($p > 0.05$): el diámetro de la lesión en M20 (*M. fructigena*) fue 3.65 ± 0.10 cm y en M23 (*M. laxa*) fue 1.99 ± 0.23 cm.

A las 96 h de la inoculación el diámetro de la zona afectada de los aislados de *M. fructigena* fue significativamente mayor que los de *M. laxa* ($p \leq 0.05$). De los aislamientos estudiados el más agresivo fue M05 (Cuadro 5). Todos los frutos testigo permanecieron sanos y no se observó ningún síntoma asociado con la pudrición marrón ocasionada por las especies de *Monilinia*. En

There were no significant differences in growth among the isolates after 72 h incubation ($p > 0.05$): lesion diameter of M20 (*M. fructigena*) was 3.65 ± 0.10 cm and that of M23 (*M. laxa*) was 1.99 ± 0.23 cm.

Ninety-six h after inoculation the diameter of the area affected by isolates of *M. fructigena* was significantly larger than that affected by *M. laxa* ($p \leq 0.05$). Of the isolates studied, the most aggressive was M05 (Table 5). All of the control fruits remained healthy and no symptoms associated with brown rot caused by *Monilinia* species were observed. In 70% of the fruits grayish white mycelia developed, beginning around the inoculated area and extending gradually as rotting progressed. After 72 h fruits inoculated with *M. fructigena* developed compact masses of mycelia and conidia distributed over the surface of the lesion (Figure 2), while on fruits inoculated with *M. laxa* sporulation developed after 96 h (Table 5) and was restricted to the area around the inoculation point.

Re-isolation of the fungus used in inoculation confirmed Koch's postulates, indicating that *Monilinia* sp. is the causal agent of brown rot.

DISCUSSION

Identification of the three *Monilinia* species and of *M. polystroma* based on morphological and cultural characteristics is problematic given that qualitative and quantitative differences can exist among colonies of isolates of a single species. According to Lane (2002), there is no specific morphological trait that distinguishes the different species. In our study some of the *M. fructigena* isolate colonies had an appearance similar to colonies characteristic of *M. laxa*.

Cuadro 5. Diámetro de las lesiones (cm) y presencia de esporulación en frutos de manzano inoculados con diversos aislamientos de *Monilinia fructigena* y *M. laxa* a las 72 h y 96 h de incubación.

Table 5. Diameter of lesions (cm) and presence of sporulation in apple fruits inoculated with different isolates of *Monilinia fructigena* and *M. laxa* after 72 and 96 h of incubation.

Aislado	Especie	Diámetro		Esporulación [†]	
		72 h	96 h	72 h	96 h
M07	<i>M. laxa</i>	2.93 ± 0.24 a	4.09 ± 0.37 a	-	±
M10	<i>M. laxa</i>	2.703 ± 0.19 a	3.893 ± 0.21 a	-	±
M17	<i>M. laxa</i>	2.353 ± 0.26 a	3.620 ± 0.27 a	-	±
M18	<i>M. laxa</i>	2.285 ± 0.25 a	3.538 ± 0.39 a	-	±
M23	<i>M. laxa</i>	1.988 ± 0.23 a	2.390 ± 0.33 a	-	±
M25	<i>M. laxa</i>	2.828 ± 0.13 a	4.235 ± 0.09 a	-	±
M27	<i>M. laxa</i>	2.735 ± 0.22 a	3.965 ± 0.25 a	-	±
M01	<i>M. fructigena</i>	2.945 ± 0.19 a	5.040 ± 0.25 b	+	++
M05	<i>M. fructigena</i>	2.088 ± 0.06 a	6.220 ± 0.02 b	+	++
M20	<i>M. fructigena</i>	3.648 ± 0.10 a	4.460 ± 1.22 b	+	++
Control	-	0.000 ± 0.00 b	0.000 ± 0.00 c	-	-

Medias con letra distinta en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

†: - no esporulación; ± esporulación escasa; + esporulación; ++ abundante esporulación.

70% de los frutos se desarrolló un micelio de color blanco grisáceo que empezaba en torno de la zona inoculada y se extendía gradualmente al progresar la pudrición del fruto. A las 72 h los frutos inoculados con *M. fructigena* desarrollaron masas compactas de micelio y conidios distribuidas por toda la superficie de la lesión (Figura 2), mientras que en los frutos inoculados con *M. laxa* la esporulación se desarrolló a las 96 h (Cuadro 5) y quedó limitada en torno a la zona de inoculación.

El reaislamiento del hongo usado en la inoculación permitió demostrar el cumplimiento de los Postulados de Koch, indicando que *Monilinia* spp. es el agente causal de la podredumbre morena.

DISCUSIÓN

La identificación de las tres especies de *Monilinia* y *M. polystroma* con base en las características morfológicas y culturales presenta dificultades dado que pueden existir diferencias cualitativas y cuantitativas de las colonias entre los aislados de una misma especie. Según Lane (2002), no hay un carácter morfológico específico que permita separar las distintas especies. En el presente estudio algunos de los aislados de *M. fructigena* se asemejaban a *M. laxa* por el aspecto de la colonia característico de esta última especie.

La tasa de crecimiento de las colonias en medios de cultivo se usa para la separación de especies. Batra (1979) estableció que *M. laxa* podía diferenciarse de *M. fructigena* y de *M. fructicola* por su menor tasa de crecimiento: *M. fructigena* tenía un crecimiento de 8 cm a los 7 d de incubación, pero el de *M. laxa* era sólo 4 cm a los 6 d de crecimiento. Según Sonoda *et al.* (1982) y Van Leeuwen y Kesteren (1998), el diámetro medio de las colonias de *M. laxa* era parecido al de *M. fructigena* a los 5 d de incubación. En el presente estudio no hubo diferencias significativas de crecimiento ($p > 0.05$) entre los aislados de *M. fructigena* y los de *M. laxa* a los 4 d. Sin embargo a los 7 d de incubación el diámetro de los aislados de *M. fructigena* fue significativamente mayor que el de los de *M. laxa* ($p \leq 0.05$).

Dado que los métodos de identificación basados en las características morfológicas y culturales no son concluyentes, es necesario usar los métodos de biología molecular. Al comparar, en el presente estudio, las características de cada aislamiento identificado por su morfología con los resultados obtenidos en la caracterización molecular, sólo 72% de los aislados inicialmente identificados con base en la morfología y medias de crecimiento de las colonias se correspondía con los resultados obtenidos mediante la PCR con iniciadores específicos. La identificación de las especies de *Monilinia* usando iniciadores específicos (Malvárez

Colony growth rate in culture media is used to separate species. Batra (1979) established that *M. laxa* can be distinguished from *M. fructigena* and *M. fructicola* by its lower growth rate: *M. fructigena* had a growth of 8 cm after 7 d of incubation, but that of *M. laxa* was only 4 cm after 6 d. According to Sonoda *et al.* (1982) and Van Leeuwen and Kesteren (1998), the mean diameter of the *M. laxa* colonies was similar to that of *M. fructigena* after 5 d of incubation. In our study there were no significant differences in growth ($p > 0.05$) between *M. fructigena* and *M. laxa* isolates after 4 d. However, on the 7th d of incubation the diameter of the *M. fructigena* isolates was significantly larger than those of the *M. laxa* ($p \leq 0.05$).

Given that the methods of identification based on morphological and cultural characteristics are not conclusive, it is necessary to use molecular biological methods. In our study, when the characteristics of each isolate identified by morphology are compared with results obtained by molecular characterization, only 72% of the isolates initially identified by morphology and colony growth in culture mediums coincided with the results obtained with PCR with specific primers. Identification of *Monilinia* species using specific primers (Malvárez *et al.*, 2001) is a useful, rapid, and reliable technique that has allowed precise identification of isolates with a single PCR reaction. The band size obtained for each isolate agrees with the results of Côté *et al.* (2004b).

M. laxa and *M. fructigena* species, of European origin, are distributed globally. But *M. fructicola*, of American origin, and frequent in America (Malvárez *et al.*, 2004), Japan, China (Zhu *et al.*, 2005) and Australia, was first introduced in Europe (France) in



Figura 2. Frutos de manzana (*P. malus*) de la variedad Golden Delicious inoculados artificialmente con *M. fructigena* aislado M17 (izquierda), con un disco de PDA, fruto testigo (centro) y con *M. laxa* aislado M05 (derecha), 72 h después de la inoculación.

Figure 2. Fruits of apple (*P. malus*) of Golden Delicious variety artificially inoculated with *M. fructigena* M17 isolate (left), with a PDA dish, control fruit (center) and with *M. laxa* M05 isolate (right), 72 h after inoculation.

et al., 2001) es una técnica útil, rápida y fiable que ha permitido determinar específicamente los aislados a partir de una única reacción de PCR. El tamaño de banda obtenido para cada aislamiento concuerda con los resultados de Côté *et al.* (2004b).

Las especies *M. laxa* y *M. fructigena*, de origen europeo, presentan distribución mundial, pero *M. fructicola*, de origen americano y frecuente en América (Malvárez *et al.*, 2004), Japón, China (Zhu *et al.*, 2005) y Australia, fue introducida por primera vez en Europa (Francia) en 2002 (OEPP/EPPO). Se identificó en Hungría en octubre de 2005 en frutos de melocotón importados de Italia y España (Petróczy y Palkovics, 2006). En 2006, la NPPO de España confirmó la presencia de *M. fructicola* en las localidades de Ivars de Noguera (Lleida, Cataluña) y de Castillonroy (Huesca, Aragón). Durante la primavera del mismo año se delimitó la zona afectada y se aplicaron las medidas fitosanitarias oportunas para erradicar dichos focos. En el presente estudio, a pesar de haberse recogido muestras de localidades relativamente próximas a las zonas afectadas (ocho muestras de la provincia de Huesca y nueve de Cataluña) no se detectó la presencia de *M. fructicola*. Por tanto, se considera que las medidas aplicadas lograron controlar la dispersión de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Las dos especies de *Monilinia* más frecuentes en España son *M. fructigena* y *M. laxa*. Los aislados fueron caracterizados como *M. fructigena* (20%) y *M. laxa* (80%). Hubo mayor agresividad de los aislados de *M. fructigena* frente a los de *M. laxa*. Dada la reciente identificación de *M. fructicola* en España, específicamente en Cataluña, y al no recuperar a *M. fructicola* en las muestras analizadas (aunque el número de muestras fue limitado), es posible afirmar que los focos de infección de esta especie fueron puntuales y limitados y no se observa una expansión de dicha enfermedad de cuarentena.

LITERATURA CITADA

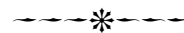
Batra, L.R. 1979. First authenticated North American record of *Monilinia fructigena*, with notes on related species. *Mycotaxon* 8: 476-484.
 Batra, L.R. 1991. World species of *Monilinia* (fungi): Their ecology, biosystematics and control. *Mycologia Mem.* 16: 1-246.
 Boehm, E.W.A., Z. Ma, and T.J. Michailides. 2001. Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. *Phytopathology* 91: 428-439.
 Byrde, R. J. W., and H. J. Willetts. 1977. *The Brown Rot Fungi of Fruit. Their Biology and Control.* Pergamon Press. Oxford. 171 p.
 Côté, M. J., M. Prud'homme, A. J. Meldrum, and M. C. Tardif. 2004a. Variations in sequence and occurrence of SSU rDNA

2002 (OEPP/EPPO). It was identified in Hungary in October 2005 in peaches imported from Italy and Spain (Petróczy and Palkovics, 2006). In 2006, the NPPO of Spain confirmed the presence of *M. fructicola* in Ivars de Noguera (Lleida, Catalonia) and Castillonroy (Huesca, Aragón). In the spring of the same year the affected region was delimited, and timely phytosanitary measures were applied to eradicate the centers of infection. In our study, although samples were collected from sites relatively close to the affected zones (eight samples from the province of Huesca and nine from Catalonia), the presence of *M. fructicola* was not detected. Therefore, it is considered that the measures applied were able to control the spread of the disease.

CONCLUSIONS

The two most frequent species of *Monilinia* in Spain are *M. fructigena* and *M. laxa*. The isolates were identified as *M. fructigena* (20%) and *M. laxa* (80%). The *M. fructigena* isolates exhibited greater aggressiveness than those of *M. laxa*. Given the recent identification of *M. fructicola* in Spain, and specifically in Catalonia, and since *M. fructicola* was not collected in any of the samples analyzed, (although the amount of samples was limited), it is possible to state that the centers of infection of this species were pin-pointed and restricted, and spread of the disease, which is subject to quarantine, was not observed.

End of the English version—



group I introns in *Monilinia fructicola* isolates. *Mycologia* 96 (2): 240-248.
 Côté, M. J., M. C. Tardif, and A. J. Meldrum. 2004b. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using Multiplex PCR. *Plant Dis.* 88: 1219-1225.
 Förster, H., and J.E. Adaskaveg. 2000. Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology* 90: 171-178.
 Fulton, C. E., and A. E. Brown. 1997. Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. *FEMS Microbiol. Letters* 157: 307-312.
 Hughes, K. J. D., C. E. Fulton, D. McReynold, and C. R. Lane. 2000. Development of new PCR primers for identification of *Monilia* species. *Bull. OEPP/EPPO* 30: 507-511.
 Ioos, R., and P. Frey. 2000. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 373-378.
 Lane, C.R. 2002. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. *Bull. OEPP/EPPO* 32: 489-493.
 Majer, D., R. Mithen, B. G. Lewis, P. Vos, and R. P. Oliver. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* 100: 1107-1111.

- Malvárez, G., A. Rodríguez, C. Aguilar, E. Silvera, y P. Mondino. 2001. Identificación de especies de *Monilinia* spp en aislamientos obtenidos de *Prunus* spp por PCR con primers específicos. *Agrociencia* V(1): 48-53.
- Malvárez, G., A. Rodríguez, C. Aguilar, A.C. Silveira, E. Silvera, J. Bargueño, y P. Mondino, 2004. *Monilinia fructicola*, única especie presente ocasionando la podredumbre morena del duraznero (*Prunus persica*) en Uruguay. *Fitopatología* 39 (3): 126-132.
- Petróczy, M., and L. Palkovics, 2006. First report of brown rot caused by *Monilia fructicola* on imported peach in Hungary. *Plant Dis.* 90: 375.
- Ogawa, J. M. and W. H. English. 1960. Relative pathogenicity of two brown rot fungi, *Sclerotinia laxa* and *Sclerotinia fructicola*, on twigs and blossoms. *Phytopathology* 50: 550-558.
- Schiffman, N. M., H. Michaely, G. Zauberman, and I. Chet. 1985. Physiological changes occurring in picket climateric fruit with different pathogenic fungi. *J. Phytopathol.* 113: 227-284.
- Snyder, C. L., and A. L. Jones. 1999. Genetic variation between strains of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. *Can. J. Plant Pathol.* 21: 70-77.
- Sonoda, R. M., J. M. Ogawa, and B. T. Manji. 1982. Use of interactions of cultures to distinguish *Monilinia laxa* from *M. fructicola*. *Plant Dis.* 66: 325-326.
- Van Leeuwen, G. C. M., and H.A. Kesteren. 1998. Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Can. J. Bot.* 76 (12): 2042-2050.
- Welsh, J., and M. McClelland. 1990. Fingers-printing genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Zhu, X. Q., X. Y. Chen, Y. Luo, and L. Y. Guo. 2005. First report of *Monilinia fructicola* on peach and nectarine in China. *Plant Pathol.* 54: 575.