



## IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE MANCHA FOLIAR DE MANZANOS DE LA PROVINCIA DE SANTA FE.

Giuliano, Berutti.

*Departamento de Producción Vegetal - Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad Nacional del Litoral  
Director/a: Maumary, Roxana Lorena  
Codirector/a: Fernandez, Laura Noemí*

Área: 8. Ingeniería

Palabras claves: *Marssonina coronaria*, Manzanos, Santa Fe

### INTRODUCCIÓN

La manzana es una de las frutas más ampliamente cultivadas en Argentina. Dadas las exigencias de frío de este cultivo, las zonas tradicionales de producción son la Provincias de Neuquén y Valle de Río Negro (Patagonia Norte) que concentran el 80% de la producción (Bruzzone, 2008).

En la Provincia de Santa Fe, los inviernos son suaves y estos requerimientos no logran completarse. No obstante en la actualidad y merced a trabajos de mejoramiento genético resultaron en el lanzamiento de tres cultivares de bajos requerimientos de frío: "Caricia" (IAPAR 77; 'Anna' × 'Prima'), "Princesa" ('Anna' × 'NJ56') y "Eva" (IAPAR 75; 'Anna' × 'Gala'). Desde hace 15 años, estos fueron introduciéndose en campos de la Provincia de Santa Fe y su comportamiento productivo ha sido muy propicio (Gariglio et al., 2014) por lo que actualmente resultan una alternativa de diversificación productiva para las fincas hortícolas de la zona Centro - Este de la provincia.

Sin embargo, la incorporación de nuevos cultivos trae nuevas interrogantes a resolver, como por ejemplo, la falta de conocimientos acerca de las enfermedades que los afectan. Así, desde el año 2011 la producción de manzanas ha atravesado distintas problemáticas fitosanitarias, dentro de las que se registran muerte de plantas por *Botryosphaeria dotidea* (Rista et al, 2011), podredumbre amarga por *Colletotrichum siamense* (Fernandez et al. 2018) y podredumbre de frutos por *Botryosphaeria* sp.

Durante el seguimiento de cultivos de manzana en la campaña 2017-2018, en los meses de noviembre-diciembre se pudo apreciar un incremento de manchas foliares que provocó una defoliación anticipada en campos frutales de más de 10 años. Las características de la sintomatología observada a campo coincidirían con aquellos citados para *Marssonina*

Título del proyecto: Estudios etiológicos y epidemiológicos de la podredumbre amarga del manzano en la provincia de Santa Fe.

Instrumento:CAI+D

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director/a: Favaro, Ma. Alejandra

ssp (Fernández Valiella, 1978, Sharma et al., 2004, Kretschmar et al., 2005, Back & Jung, 2014, Back et al., 2015). Las lesiones típicas de éste patógeno se caracterizan por manchas foliares de color pardo oscuro con pequeñas acérvulas negras en la superficie de la hoja. A medida que la enfermedad progresa las manchas coalescen y se tornan oscuras; posteriormente las hojas se vuelven amarillas y se caen (Takahashi y Sawamura 1990). Éste patógeno se propaga por el agua (lluvia, riego por aspersión) y para la germinación de los conidios se requiere una humedad relativa alta, 92% o más, durante un tiempo mínimo de seis horas.

*Marssonina* spp. fue reportada en países como Corea y China, en América del Norte, y en países de Europa, provocando defoliaciones de hasta el 87% que se traducen en importantes pérdidas económicas, reduciendo la cantidad y calidad de las manzanas y afectando el inicio de la floración siguiente (Harada et al., 1974, Lee & Shin, 2000; Lee et al., 2011; Wöhner & Emeriewen, 2019).

En Argentina no se registran informes de éste patógeno para hojas de manzanos; así los reportes existentes para *Marssonina* se limitan a hojas, estolones y pecíolos de frutilla (*M. fragariae*) (Fernández Valiella, 1978); hojas de rosa sp (*M. rosae*) en Corrientes y Noroeste Argentino (Bonacic Kresic & Campagnac, 1982; Cabrear et al., 2006; Wright et al., 2001), salicáceas (*M. nigricans*) en Mendoza (Lucero et al., 2011), hojas y ramas de sauce álamo (*Salix alba* v. *calva*); hojas de Sauce llorón (*Salix babylonica*) con (*M. salicicola*), hojas de Sauce híbrido (*S. x argentinensis* cv. *Híbrido*) (*M. kriegeiriana*) en el Delta del Paraná (Fernández Valiella, 1978). De lo expuesto hasta aquí se desprende la importancia de la generación de información nacional y regional sobre el conocimiento del/los agentes causales de mancha foliar en plantaciones de manzano; para poder establecer estrategias de manejo integrado, convenientes y oportunas para el control de dicha sintomatología.

## OBJETIVOS

- Contribuir al conocimiento y caracterización etiológica y epidemiológica de patógenos causantes de manchas foliares en manzanos de la Provincia de Santa Fe.

## METODOLOGÍA

El trabajo se llevó a cabo en el Campo Experimental de Cultivos Intensivos y Forestales (CECIF) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias. Se recolectaron hojas con sintomatología de manchas foliares de los cvs 'Caricia', 'Princesa' y 'Eva'. Para la obtención de aislamientos, a partir de los márgenes de lesiones que desarrollaban acérvulas, se cortaron fragmentos de 3 a 5 mm y previo a la siembra en medio de cultivo AA (agar agua) se acondicionaron mediante técnica de desinfección seriada. Luego se incubaron en la oscuridad a 20°C por dos semanas. Para la producción de cultivos monospóricos en APD se utilizó la técnica propuesta por Lee et al. (2011). Los cultivos obtenidos se conservaron en papel de filtro y Agua Destilada Estéril (ADE) a 25°C para futuros usos.

Colonias de 60 días de crecimiento en APD se caracterizaron morfológica y fenotípicamente. Además se evaluaron características microscópicas y mediante el programa Image J se midió largo y ancho de 50 conidios por aislado y se compararon los resultados con la bibliografía existente.

Por tratarse de un patógeno no reportado en la región se realizaron pruebas de patogenicidad en hojas de manzanas de los mismos cultivares de los cuales los aislamientos fueron extraídos. Para lograr el inóculo se utilizó la técnica de Yin et al.

(2013) ajustando la concentración a  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ . Para el ensayo, un conjunto de ramas terminales jóvenes con 5-6 hojas, se inocularon mediante la técnica propuesta por Alaniz et al. (2018) y se incubaron a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y 12 horas de fotoperiodo evaluando periódicamente la reproducción de síntomas. Las ramas con hojas control fueron rociadas con ADE. Para completar los postulados de Koch, el microorganismo se re aisló de las lesiones generadas a partir de la inoculación y sus características se compararon con las inicialmente registradas.

Ante la falta de datos concretos de los sitios de sobrevivencia de éste patógeno, especialmente para cultivos de manzanos, se estudió la sobrevivencia de *Marssonina* spp. durante el año 2018. Se muestrearon en tres épocas del año hojas caídas, ramas de poda y frutos momificados en el suelo, mientras que de la parte aérea se extrajeron yemas, flores y hojas. La expresión del signo de *Marssonina* spp se forzó según la metodología utilizada por Hamada & De-Mio (2012). Las muestras de tejido vegetal obtenidas en el campo se llevaron al laboratorio y se colocaron en bandejas a  $-18^\circ\text{C}$  por una hora y luego colocadas en oscuridad a  $24^\circ\text{C}$  por 5 días. Mediante lupa y microscopio se procedió a observar la presencia o ausencia del signo.

## Resultados y Discusión

En los años de estudio (2017-2019) se registraron diferentes lesiones foliares, siendo las de mayor relevancia lesiones necróticas, pequeñas, marrones, que al aumentar en tamaño coalescían y con el tiempo provocaban amarilleo y caída de las hojas. De ésta sintomatología se aisló *Marssonina* spp.

*Marssonina* spp. es particularmente difícil de cultivar in vitro porque crece muy lentamente en medios artificiales, lo que aumenta la probabilidad de contaminaciones (Harada et al., 1974; Lee, 2011). Así se lograron 9 aislados (tres de cada cv. de manzano) con características de éste género. Luego de 60 días de incubación a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , las colonias alcanzaron un diámetro de hasta 10 mm de ancho y 1-5 mm de alto, con márgenes de color marrón claro, irregulares y centro de color marrón oscuro, conformada por una masa compacta de conidios. El micelio se veía inmerso, semi-hialino y septado. Cuando las colonias empezaban a envejecer se tornaban color marrón oscuro – negro y con aspecto arrugado en su superficie, coincidiendo estas características morfológicas con las que reportan Tamietti & Matta (2003), Sharma et al., (2009) y Lee (2011) para el género *Marssonina*. Los conidios observados en todos los aislamientos fueron hialinos, ligeramente curvados, ovoides, bi-celular con diferencias de tamaño entre una célula y otra, ocasionalmente se observaron conidios con tres células. Además pudo observarse entre uno y tres núcleos dentro de cada célula. El valor medio del largo y ancho de los conidios fue de  $17,8 \pm 3,1 \mu\text{m} \times 7,7 \pm 1,9 \mu\text{m}$ . Los mismos se encontraban sostenidos por conidióforos cortos. Todas estas características morfológicas se corresponden con las reportadas para *Marssonina coronaria*, teleomorfo *Diplocarpon mali* (Harada et al., 1974; Lee & Shin, 2000; Heidenreich & Turechek, 2001; Sharma et al., 2004; Lee et al., 2011; Zhao et al., 2013, Ivić et al., 2017).

En nuestro sistema productivo no se registró desarrollo de estructuras de origen sexual, lo que indicaría que el patógeno permanece latente en forma de acérvulas/conidios en brotes esporádicos que se producen durante el reposo invernal de los frutales, en ramas y/o en hojarasca. Los inviernos de la región, si bien son marcados, registran eventuales situaciones con temperaturas por encima de las medias que se reflejan a campo con árboles de manzanos que presentan brotes desarrollados y hojas expuestas. Muestras tomadas para verificar sitios de sobrevivencia del patógeno indicaron la presencia de conidios de *Marssonina* en hojas y ramitas jóvenes. En Argentina no existen reportes de la forma de sobrevivencia de esta especie; sólo se registran reportes de Fernandez

Valiella (1978) indicando como probable sitio de sobrevivencia de *M. salicícola* los canchales que se forman en ramas y ramitas de sauce; mientras que Vegh (1974) citado por Fernandez Valiella (1978) indicaría la formación de apotecios en hojas caídas durante el otoño que en primavera se activarían para infectar las nuevas hojas. Estos datos nos estarían señalando otro factor a tener en cuenta al momento de diseñar estrategias de manejo. Posteriormente se procedió a realizar pruebas de patogenicidad. Todos los aislados fueron capaces de producir las lesiones típicas de *Marssonina*. Para cumplimentar con los postulados de Koch, el patógeno fue re-aislado coincidiendo sus características morfológicas con las inicialmente descritas para el género *Marssonina*. Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se registra a *Marssonina coronaria* afectando manzano en Argentina. A nivel mundial, *Marssonina coronaria* es la especie que se registró en árboles de manzano en Japón, Canadá, Korea, India, Italia (Engler 1906; Parmelee 1971; Lee & Shin 2000; Sharma 2000; Tamietti & Matta 2003), China (Jiang et al., 2005; Li et al., 2005; Zhou et al., 2008; Zhao et al., 2009), Panamá (Piepenbring et al., 2011), Alemania, Suecia (Hinrichs-Berger & Müller, 2013), Francia (Le Corre, 2015), Croacia (Ivić et al., 2017) y Brasil (Kretschmar et al., 2005) generando importantes problemas en la producción, afectando directamente el vigor de las plantas y la floración de años siguientes. Es para destacar que en Brasil el reporte de la enfermedad se realizó sobre plantaciones de manzanos del cv EVA; éste es uno de los tres cultivares que se encuentran implantados en la región Centro de Santa Fe. Junto a Caricia, Princesa, Condessa y Annabella son los que conforman las plantaciones que se registran en el centro norte entrerriano, San Luis del Palmar y Santa Rosa (Corrientes), Cerro Azul (Misiones), Colonia Caroya (Córdoba) y localidades de Catamarca, La Rioja, Tucumán y Buenos Aires, marcando esto la importancia para seguir profundizando el estudio de ésta patología. Ante esto, en proceso de avance y a la espera de resultados se encuentra la caracterización molecular de los aislados obtenidos.

## CONCLUSIONES

La caracterización morfológica indicó que todos los aislados pertenecen al género *Marssonina*. Este análisis permitió aproximarnos a *M. coronaria* como la especie asociada a los síntomas de mancha foliar, pero el análisis filogenético y de secuencias de ITS deberá confirmar esto. Las pruebas de patogenicidad demostraron que *Marssonina* es la especie responsable de causar mancha foliares en manzanos de la Provincia de Santa Fe. En función de los resultados obtenidos, se continuará trabajando para determinar la existencia de otras fuentes de sobrevivencia y se realizarán ensayos de sensibilidad a diferentes fungicidas para lograr establecer una estrategia de manejo.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Back, C.G. & H.Y. Jung.** (2014). Biological characterization of *Marssonina coronaria* infecting apple trees in Korea. *Kor. J. Mycol.* 42:183-190.
- Sharma, N., V.S. Thakur, J. Mohan, S.M.P. Khurana and S. Sharma.** (2009). Epidemiology of *Marssonina blotch (Marssonina coronaria)* of apple in India. *Indian Phytopathology* 62 (3): 348-359.
- Takahashi, S., & Sawamura, K.** (1990). In A. L. Jones & H. S. Aldwinckle (Eds.), *Compendium of apple and pear diseases* (p. 33). St. Paul: American Phytopathological Society.
- Lee, D., Back, C., Win, N., Choi, K., Kim, K., Kang, I., Choi, C., Yoon, T., Uhm, J; Jung, H.** (2011). Biological Characterization of *Marssonina coronaria* Associated with Apple Blotch Disease. *Mycobiology* 39(Vol 3): 200-205.