

DICIEMBRE 2023 N°16

# BOLETÍN DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOPATÓLOGOS

ISSN: 2618-1932



CARACTERIZACIÓN Y CONTROL DE LA MANCHA MARRÓN DEL  
PERAL EN EL VALLE DE RÍO NEGRO, ARGENTINA

# CARACTERIZACIÓN Y CONTROL DE LA MANCHA MARRÓN DEL PERAL EN EL VALLE DE RÍO NEGRO, ARGENTINA

Tudela, M.A.A.<sup>1,2,3</sup>, Temperini, C.V.<sup>1,3</sup>, Di Masi, S.N.<sup>2</sup>, Pose, G.N.<sup>4,5</sup>  
(Capítulo Patagonia)

1. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 2. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Alto Valle (EEA), Allen, Río Negro. 3. Universidad Nacional de Río Negro (UNRN), Villa Regina, Río Negro. 4. Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ). 5. Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET-UNSAM) - Escuela de Bio y Nanotecnologías (UNSAM), Argentina.

Contacto: [tudela.alumine@inta.gob.ar](mailto:tudela.alumine@inta.gob.ar)

## RESUMEN

La mancha marrón del peral, causada por *Stemphylium vesicarium*, es una enfermedad reportada en diferentes regiones productoras de peras en Europa, que recientemente ha sido detectada en el Alto Valle de Río Negro, Argentina. Por ser una nueva patología, no se contaba con información local sobre el comportamiento del patógeno ni estrategias de manejo. En el presente trabajo se caracterizó el patógeno y su ciclo de vida, se determinó la susceptibilidad de las principales variedades de pera cultivadas en la región, y se evaluaron medidas de manejo. Se obtuvieron 164 aislamientos de *S. vesicarium* a partir de hojas, frutos y muestreos de aire, y se realizó la caracterización morfológica y molecular de un grupo representativo de ellos. Se llevaron a cabo estudios de susceptibilidad varietal utilizando hojas y frutos de las variedades Williams, Packham's, d'Anjou y Abate Fetel. Adicionalmente, se evaluó el momento de mayor susceptibilidad al patógeno en diferentes etapas de desarrollo de los frutos. Como estrategias de manejo de la enfermedad, se realizaron ensayos in vitro utilizando cuatro fungicidas comerciales.

## INTRODUCCIÓN

El Alto Valle de Río Negro es una región importante para la producción de frutales de pepita, y actualmente cuenta con una superficie cultivada de 18.266 hectáreas cultivadas de peras (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022). Las variedades más importantes cultivadas en la zona son Williams, Packham's, d'Anjou y Abate Fetel. La mancha marrón del peral se detectó por primera vez en Argentina en la zona de Valle Medio en el año 2013 (Dobra and García, 2015), y en 2016 fue detectada en el Alto Valle, momento a partir del cual ha sido recurrente y

ha causado diferentes niveles de daño en peras (Tudela *et al.*, 2018; Tudela and Di Masi, 2022; Temperini *et al.*, 2022). Sin embargo, hasta ahora, no se contaba con información local sobre el comportamiento del patógeno ni de estrategias de control. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo caracterizar el agente causal, determinar la susceptibilidad de las variedades cultivadas y evaluar medidas para el control de la enfermedad.



## CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL

---

Durante un período de seis años, se obtuvo una colección de 164 aislamientos de *S. vesicarium*, incluyendo 150 cepas de hojas y frutos y 14 de aire. Los aislamientos de aire fueron obtenidos desde ocho establecimientos rurales de la región con un muestreador microbiológico impactador multiorificio, durante tres años consecutivos (2014-2017). La frecuencia de muestreo fue una vez por cada estación del año (en la mitad de cada trimestre) en horas de la mañana. El recuento anual promedio de *S. vesicarium* fue de 2 UFC/m<sup>3</sup> y su frecuencia relativa respecto de los otros géneros fúngicos aislados fue del 0,05% (Temperini *et al.*, 2019). Si bien no fue predominante, habiéndose determinado en aire previamente al aislamiento de material vegetal, fue establecida así la presencia de inóculo en la región. Los aislamientos desde tejido vegetal fueron obtenidos en el período 2016-2020. Las hojas y frutos sintomáticos se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril (ADE) y mediante un corte con bisturí estéril se tomaron trozos de tejido de la zona de avance y se sembraron en placa de Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA.

Se realizó la caracterización morfológica y molecular de una sub-muestra de 32 aislamientos monospóricos. En los medios de cultivo V8 (jugo de vegetales) y PZA (papa – zanahoria – agar), los conidios exhibieron un

desarrollo individual, presentando una morfología ovoide a oblonga, dimensiones medias de 24 µm de largo por 14 µm de ancho, color marrón, y conteniendo de 1 a 5 septos transversales, así como de 0 a 3 septos longitudinales. En cuanto a los pseudotecios, mostraron una forma redonda u ovalada, con un diámetro que osciló entre 1 y 2 mm, y color marrón a negruzco. Las ascas se caracterizaron por ser hialinas y albergar 8 ascosporas de forma oblonga o elipsoidal, con un tono amarillento a amarronado. Cada ascospora presentó dimensiones medias de 34,5 µm de longitud por 11 µm de ancho, con la presencia de hasta 6 septos transversales y múltiples septos longitudinales (Temperini *et al.*, 2022). Las características morfológicas coincidieron con descripciones previas de aislamientos de *S. vesicarium* de diferentes países europeos (Puig *et al.*, 2015). Para la identificación molecular, mediante amplificación por PCR se obtuvieron fragmentos parciales del gen del factor de elongación de traducción 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ), utilizando los cebadores EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG y EF1-986R: TACTTGAAGGAACCCTTACC, y se secuenciaron para identificar los aislamientos. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en GenBank y comparadas con secuencias de dicha base de datos. Los resultados confirmaron la identidad del patógeno (Temperini *et al.*, 2022).

## SINTOMATOLOGÍA DE *S. vesicarium*

---

Los síntomas de la mancha marrón del peral causada por *S. vesicarium* en el Alto Valle se caracterizaron a partir de muestras recolectadas en un periodo de cuatro años. Se evaluaron aproximadamente 300 frutos y hojas de las variedades Williams, Packham's, d'Anjou y Abate Fetel, procedentes de diferentes sitios de la región. Los síntomas observados en frutos consistieron en manchas circulares de color marrón oscuro a negro, con una consistencia dura y ligeramente deprimida, a veces rodeadas por un halo rojizo (Figura 1A). La podredumbre se presentó en forma de una cuña de consistencia seca que penetraba en la pulpa. El tamaño de las manchas varió entre 5 y 41 mm de diámetro, con un promedio de 21,54 mm. La mayoría de las lesiones se encontraron en las zonas calicinal y ecuatorial de los

frutos. En las variedades Packham's y Williams, el diámetro de las lesiones osciló entre 5 y 15 mm, mientras que en d'Anjou y Abate Fetel fue de 10 a 41 mm. En las hojas, los síntomas comenzaron como manchas circulares de color marrón oscuro intenso y se expandieron progresivamente hacia los bordes, entre las nervaduras, formando una mancha en forma de "V", típica de esta patología según los reportes bibliográficos (Figura 1B). Se observó, además, una caída prematura de las hojas afectadas, principalmente en las variedades d'Anjou y Abate Fetel. Estos síntomas coinciden también con los descriptos en zonas productivas europeas (Lorente & Montesinos, 2006).





**Figura 1.** Síntoma de mancha marrón del peral en la variedad Abate Fetel, en fruto (A) y hoja (B).

## CICLO DE LA ENFERMEDAD

Se identificaron dos tipos de esporas producidas por *S. vesicarium*: ascosporas y conidios. Se observó que los pseudotecios se desarrollan sobre los restos de hojas y frutos afectados y maduran durante el invierno, constituyendo el inóculo primario (Figura 2A). A partir de los meses de octubre y noviembre se registró una proporción importante de ascosporas maduras y el registro de liberación de ascosporas se produjo luego de la

ocurrencia de lluvias (Tudela *et al.*, 2021). Se encontró una producción escasa de conidios en los frutos y hojas afectados, considerado como inóculo secundario (Figura 2B).

Las condiciones óptimas para el desarrollo de la infección son períodos de al menos 10 horas de hoja mojada y temperaturas entre 20 y 25 °C.

## SUSCEPTIBILIDAD VARIETAL

Se llevaron a cabo ensayos de inoculación in vitro en hojas y frutos de las variedades Williams, Packham's, d'Anjou y Abate Fetel para evaluar su susceptibilidad al patógeno. Las inoculaciones en frutos fueron realizadas con suspensiones conidiales ajustadas a una concentración de  $5 \times 10^5$  conidios/mL. Los frutos evaluados correspondieron a tres etapas de desarrollo: joven: 55-60 días después de la plena floración (ddpf), medio: 85-90 ddpf, y madurez comercial. En cada caso, fueron sumergidos en una suspensión conidial durante un minuto y colocados en

cámaras húmedas durante 7 días. Se determinó el porcentaje del área del fruto afectada por manchas utilizando una escala de severidad. Las inoculaciones en hojas se realizaron por aspersión, aplicando 0,5 mL de suspensión conidial por hoja con un atomizador. Éstas, se incubaron individualmente en cajas de Petri selladas con film (Parafilm™), a 25 °C durante 48 horas en oscuridad (Tanahashi *et al.*, 2017). Al finalizar la etapa de incubación (2 días), se determinó el número de manchas por cm<sup>2</sup> de área foliar.



**Figura 2.** Pseudotecio con ascas y ascosporas (A), conidios de *S. vesicarium* (B).

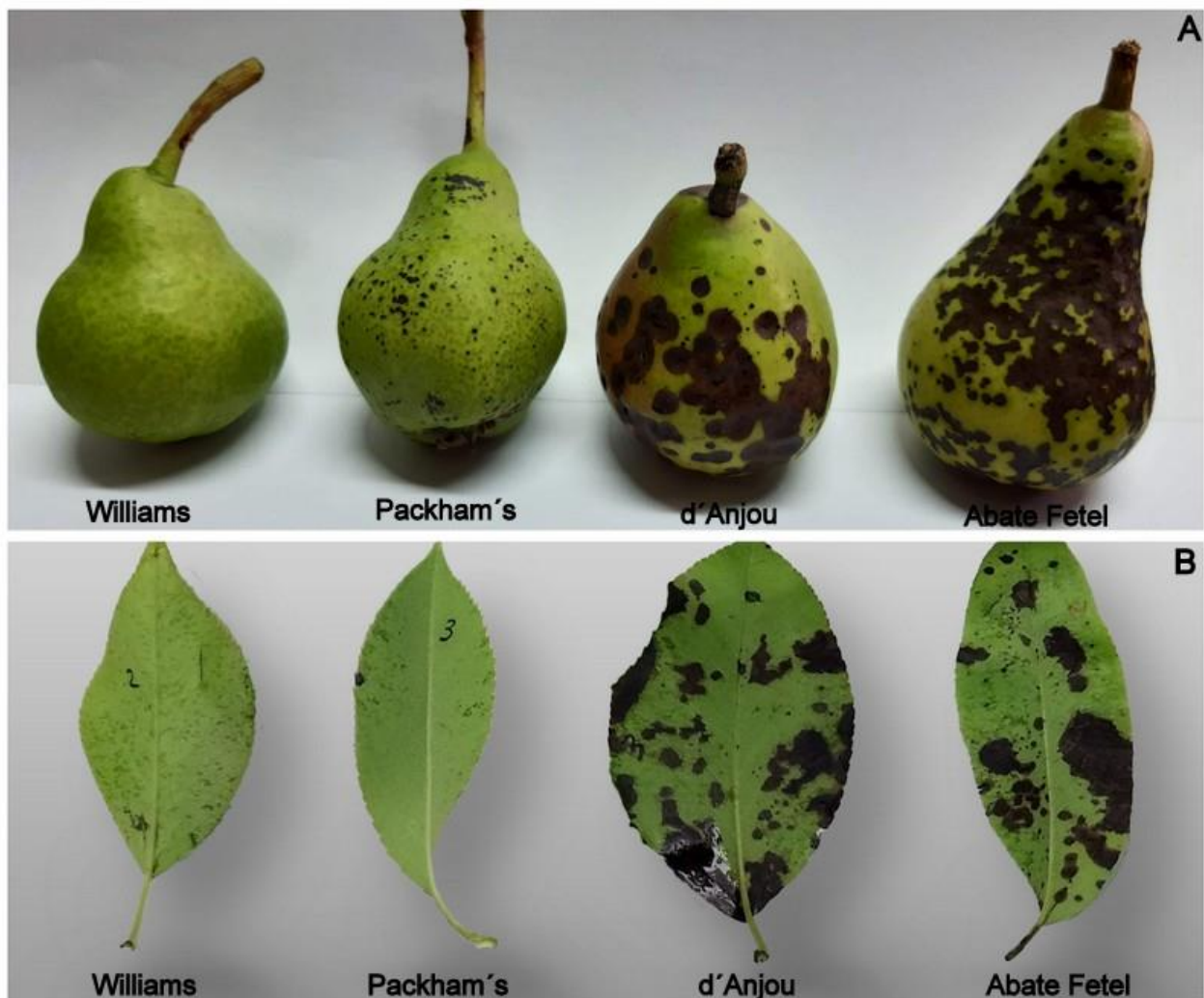
Los resultados mostraron que los frutos de d'Anjou y Abate Fetel fueron los más sensibles a la enfermedad, seguidos por Packham's, mientras que Williams mostró una menor susceptibilidad (Figura 3A). La severidad de la enfermedad fue significativamente mayor en las etapas de fruto joven y medio en comparación con aquellos en la etapa de madurez comercial (Tabla 1). Williams, siendo la variedad menos susceptible, presentó los valores más bajos

de incidencia en todas las etapas de desarrollo del fruto (Tudela *et al.*, 2023). Estos resultados indicarían que la edad del fruto tiene una influencia significativa en la susceptibilidad, y que la elección de la variedad es un factor determinante en el desarrollo y progresión de las lesiones. En cuanto a las hojas, los resultados demostraron que d'Anjou y Abate Fetel fueron los cultivares más sensibles (Figura 3B).

**Tabla 1.** Severidad de mancha marrón (porcentaje de área del fruto afectada) en cuatro variedades de pera y en tres momentos de desarrollo.

Variedad	Edad del fruto	Porcentaje de área afectada (media $\pm$ DE)*	Grupo
Williams	joven	1,14 $\pm$ 0,32	a
	medio	0,39 $\pm$ 0,18	a
	maduro	0,67 $\pm$ 0,24	a
Packham's	joven	6,30 $\pm$ 0,74	b
	medio	3,36 $\pm$ 0,54	a
	maduro	3,84 $\pm$ 0,58	ab
d'Anjou	joven	33,81 $\pm$ 1,73	c
	medio	16,10 $\pm$ 1,19	b
	maduro	9,51 $\pm$ 0,92	a
Abate Fetel	joven	34,83 $\pm$ 1,76	c
	medio	20,15 $\pm$ 1,33	b
	maduro	9,06 $\pm$ 0,89	a

\*Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey, anidado por variedad.



**Figura 3.** Susceptibilidad de las variedades Williams, Packham's, d'Anjou y Abate Fetel a nivel de hoja (A) y de fruto (B).

## CONTROL QUÍMICO

En Argentina, no hay registros de fungicidas para el control de la mancha marrón del peral. Se evaluaron 4 fungicidas comerciales en ensayos in vitro sobre frutos: pyraclostrobin 12,8% + boscalid 25,2% (Bellis® WG, Basf), ziram 76% (Ziram® 76 WG, Agristar), captan 83% (Merpan® 83 WP, Adama), y aceite de árbol del té 22,25% (Timorex Gold® 22.25 EC, Brometan). Los fungicidas se aplicaron de manera preventiva a campo en árboles de la variedad d'Anjou. A las 24 horas de la aplicación, 30 frutos por tratamiento fueron cosechados, trasladados al laboratorio e inoculados mediante aspersión de suspensión conidial. Se incubaron por 7 días en cámara húmeda, y transcurrido dicho período se determinó el porcentaje de frutos con síntomas de mancha marrón y el número de manchas por fruto.

Los frutos tratados con pyraclostrobin + boscalid presentaron el 12,5% de frutos afectados y una severidad media de  $0,12 \pm 0,06$  manchas por fruto. Con captan, la incidencia fue del 45%, y la severidad  $<5$  manchas por fruto; con ziram, incidencia del 60% y  $1,11 \pm 0,23$  manchas por fruto, y con aceite de árbol del té, 100% de incidencia y una severidad mayor a 5 manchas por fruto. Se analizó la variable severidad (número de manchas por fruto según el tratamiento), y el test de medias del modelo obtenido indicó que el fungicida más eficiente fue pyraclostrobin + boscalid, seguido de captan y ziram, mostrando una reducción de entre 99 y 98% de manchas por fruto (Tabla 2). El aceite de árbol del té logró una reducción del 73% de las manchas en los frutos inoculados, respecto al control (Tudela *et al.*, 2023).



**Tabla 2.** Eficacia de tratamientos preventivos en peras d'Anjou, aplicados 24 horas antes de la inoculación con la cepa SF23 de *S. vesicarium*.

Tratamiento	Incidencia (%) <sup>a</sup>	Severidad <sup>b</sup>	Control (%)	Grupo
Pyraclostrobin + boscalid	12,50 ± 5,23	0,12 ± 0,06	99,8	A
Captan	45,00 ± 7,87	0,50 ± 0,14	99,3	Ab
Ziram	60,00 ± 7,75	1,11 ± 1,23	98,5	B
Aceite de <i>M. alternifolia</i>	100,00 ± 0,00	19,44 ± 1,33	73,7	C
Control	100,00 ± 0,00	73,85 ± 3,22	0	D

Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey

a. porcentaje de frutos afectados (media ± DE). b. manchas por fruto (media ± DE).

## CONCLUSIONES

El patógeno se identificó morfológica y molecularmente, constituyendo la primera identificación molecular de *Stemphylium vesicarium* sobre perales en Argentina. Se confirmó su ciclo de vida en la zona del Alto Valle y se identificaron las condiciones climáticas predisponentes para el desarrollo de la enfermedad, proporcionando información relevante para el manejo y control efectivo de la mancha marrón del peral en la región. Este trabajo permitió la caracterización de los síntomas de la mancha marrón del peral en las principales variedades cultivadas en el área de estudio, brindando herramientas para su

reconocimiento. Se identificó a las variedades d'Anjou y Abate Fetel como las más susceptibles, tanto a nivel de hojas como de frutos, y que los tejidos jóvenes son los más sensibles. Se determinó que el uso preventivo de los fungicidas Bellis®, Ziram®, y Merpan® es eficaz para el manejo de la enfermedad. Los resultados obtenidos proporcionan información importante para el manejo de la mancha marrón del peral en el Valle de Río Negro, contribuyendo así a la sustentabilidad de la producción de peras en la región.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dobra, A.C. y L. Garcia. 2015. Presencia de mancha negra del peral, *Stemphylium vesicarium*, en el Valle Medio del Río Negro, Patagonia Argentina. XXXVIII Congreso Argentino de Horticultura. Bahía Blanca. Buenos Aires. pp 34(85):73.
- Llorente, I. and E. Montesinos. 2006. Brown spot of pear: An emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease*, 90(11), 1368–1375. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1368>.
- Puig, M.; L. Ruz; E. Montesinos; C. Moragrega and I. Llorente. 2015. Combined morphological and molecular approach for identification of *Stemphylium vesicarium* inoculum in pear orchards. *Fungal biology*, 119(2-3), 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.11.006>.
- Rossi, V.; E. Patteri; S. Giosué y R. Bugiani. 2005. Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology*, 111(4), 361–370. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-5273-3>.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2022. Frutales de Pepita. Pera y Manzana. Informe 2021 y avance 2022. <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/09/perasymanzanas-sep2022-1.pdf>
- Tanahashi M.; S. Okuda; E. Miyazaki; R. Parada; A. Ishihara; H. Otani and K. Osaki-Oka. 2017. Production of Host-selective SV-toxins by *Stemphylium* sp. causing Brown Spot of European Pear in Japan. *Journal of Phytopathology*. 165: 189-194. <https://doi.org/10.1111/jph.12549>.
- Temperini, C.V., M.L. Franchi; M.E.B. Rozo; M. Greco; A. Pardo and G.N. Pose. 2019. Diversity and abundance of airborne fungal spores in a rural cold dry desert environment in Argentinean Patagonia. *Science of The Total Environment*, 665, 513-520. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.115>.

- Temperini, C.V.; M.A.A. Tudela; G.N. Giménez; S.N. Di Masi; A. Pardo and G.N. Pose. 2022. Brown spot of pear, an emerging disease in Argentina: identification and pathogenicity characterization of Argentinean *Stemphylium vesicarium* isolates. European Journal of Plant Pathology. [163, 529–544.](https://doi.org/10.1007/s10658-022-02493-y) <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02493-y>.
- Tudela M.A.A.; L. Benazzi; G.N. Pose and S.N. Di Masi. 2018. Reporte de *Stemphylium vesicarium*, agente causal de la mancha negra en perales. Congreso Argentino de Microbiología. Póster C39, pag. 389. <https://sites.google.com/view/camaya2018/programa/libro-de-res%C3%BAmenes>.
- Tudela M.A.A.; S.N. Di Masi y G.N. Pose. 2021. Evolución de las estructuras invernantes de *Pleospora herbarum*, fase sexual de *Stemphylium vesicarium*, en perales del Alto Valle de Río Negro, Argentina. V Congreso Argentino de Fitopatología. <https://drive.google.com/file/d/1J8OmiWSCjgd13-MQfTtTxK7U85nijiaO/view>.
- Tudela, M.A.A. y S.N. Di Masi. 2022. La mancha marrón del peral. Boletín Sanitario N° 7. INTA Alto Valle. <https://inta.gob.ar/documentos/presencia-de-la-enfermedad-mancha-marron-del-peral>.
- Tudela M.A.A.; M.C. Lutz; G.N. Giménez; D. Del Brío; S.N. Di Masi; G.N. Pose and J.P.E. Molina. 2023. Efficacy of fungicides against brown spot of pear in Argentina. Crop Protection. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106425>
- Tudela, M.A.A.; G.N. Giménez; S.N. Di Masi; G.N. Pose and M. Basanta. 2023. Susceptibility of South American pear cultivars to brown spot of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. Journal of Plant Diseases and Protection. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00783-z>.