

Evaluación in vitro de fungicidas para el control de *Monilinia spp.* que afecta el cultivo de durazno (*Prunus persica*) en provincias de la Sierra Ecuatoriana

Venancio Arahana^{1,*}, Estefanía Borja¹, Cristina Salgado¹, José Tobar¹ y María de L. Torres¹.

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito.
Diego de Robles s/n y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador.

*Autor principal/Corresponding author; e-mail: varahana@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: C. Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 05/10/2012. Aceptado/Accepted: 06/01/2012.

Publicado en línea/Published on Web: 06/30/2012. Impreso/Printed: 06/30/2012.

Abstract

Monilinia spp. is a phytopathogen that affects peach crops in the Ecuadorian highlands causing a disease known as brown rot. This disease represents a limiting factor in the crop's yield, producing losses of up to 50%. The aim of this study was to evaluate the efficiency of five commercial fungicides used for the control of *Monilinia* in 4 Ecuadorian provinces (Carchi, Imbabura, Pichincha and Tungurahua). For this purpose, fungi were isolated from peach fruits presenting the typical disease symptoms, and 21 samples were positively identified as *Monilinia* by morphological analysis (mycelium stain and spore shape). To evaluate the fungicide efficiency, the EC₅₀ value (the effective fungicide concentration at which 50% of the conidial germination is inhibited) was determined using samples from Imbabura, Carchi and Tungurahua. It was found that the five fungicides tested (Bravo, Mertec, Rovral, Tilt and Switch) were very efficient in controlling this phytopathogen (EC₅₀ < 0.01 µg/ml). This research presents a useful approach for the establishment of strategies to control and prevent *M. fructicola* in peach cultivars and other crops that may be susceptible to this fungus in the country.

Keywords. *Monilinia spp.*, brown rot, fungicide, EC₅₀

Resumen

Una de las enfermedades que afecta al cultivo de durazno en la Sierra Ecuatoriana es producida por el hongo *Monilinia spp.*; se la conoce como podredumbre morena o parda y constituye un factor limitante del rendimiento de esta fruta, ya que produce pérdidas mayores al 50%. El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la eficiencia de cinco fungicidas comerciales usados para el control de la enfermedad. Para esto se aisló el hongo de frutos de durazno que presentaban la sintomatología de la enfermedad, obteniéndose un total de 21 aislamientos los cuales fueron escogidos mediante análisis morfológico (coloración de micelio y forma de esporas). La evaluación de los fungicidas se hizo mediante la determinación del EC₅₀ (concentración de fungicida a la que el 50% de las esporas del hongo deja de germinar) en aislamientos de Imbabura, Carchi y Tungurahua; se encontró que los cinco fungicidas (Bravo, Mertec, Rovral, Tilt y Switch) utilizados para este experimento resultaron ser muy efectivos (EC₅₀ < 0.01 µg/ml) para el control del fitopatógeno. Los resultados de esta investigación pueden contribuir a establecer métodos eficientes para el control y prevención de *Monilinia* tanto en cultivos de durazno, como en otros frutales sensibles a este fitopatógeno.

Palabras Clave. *Monilinia spp.*, podredumbre morena, fungicida, EC₅₀

Introducción

El durazno (*Prunus persica*) es un árbol deciduo, originario del Oeste de China, que pertenece a la familia Rosaceae. Puede alcanzar una altura de 8 metros, su fruto se caracteriza por presentar un endocarpio endurecido y un mesocarpio carnoso [1]. Este frutal puede llegar a tener una vida media de 12 a 17 años, alcanzando su edad productiva a partir del sexto o séptimo año. La floración

del árbol es inducida por la acumulación de entre 600 a 900 horas frío, las mismas que varían de acuerdo a la variedad de durazno. En los países tropicales, la necesidad de horas frío se compensa mediante la aplicación de compuestos hormonales [2].

En el mercado mundial el durazno se comercializa de forma fresca y en productos procesados, como conservas, pulpas, mermeladas, jugos y jaleas [3]. En el Ecu

ISSN 1390-5384



dor se estima que la producción de durazno alcanza los 3.125 TM anuales, con aproximadamente 650 hectáreas de tierra cultivadas [4]. A pesar de que la producción de esta fruta se ha incrementado en los últimos años, el abastecimiento nacional es limitado por diferentes factores, entre los más importantes están las enfermedades causadas por hongos, especialmente la que es producida por *Monilinia spp.* Este hongo provoca la podredumbre morena o “Brown rot” que ataca a las plantas en la etapa de floración, madurez del fruto y especialmente en la etapa post - cosecha (transporte, almacenamiento y venta en el mercado); sin un manejo adecuado las pérdidas pueden superar el 80 %. La podredumbre morena, conocida de esta forma por atizar las inflorescencias, ramas y el fruto, provoca una condición en el fruto de durazno denominada “momia” o fruto momificado, el mismo que constituye el principal reservorio de esporas [5].

Monilinia spp. está clasificada dentro de los hongos superiores y pertenece a la subdivisión de los Ascomycetos. La fase asexual del hongo se denomina Monilia y se produce cuando las hifas terminan en conidios, los cuales son las esporas asexuales externas. La fase sexual consiste en la formación de ascosporas, que son grupos de ocho esporas dentro de un saco [5]. Estas ascas tienen la apariencia de copa, por lo que se agrupan dentro de la clase Discomycetes. *Monilinia* pertenece al orden Helotiales y a la familia Sclerotiniaceae. Actualmente se conocen cuatro especies de *Monilinia*: *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola* y *M. polystroma* [6].

Para controlar la infección que causa este hongo se encuentran disponibles en el mercado diferentes tipos de fungicidas, algunos son sistémicos y otros de contacto. Los primeros son absorbidos y diseminados por los tejidos de la planta, brindándole mayor protección contra la colonización del hongo [7]. Mientras que los fungicidas de contacto, protegen a la planta en la superficie donde han sido rociados, evitando que los esporangios germinen y penetren en las células [8]. A nivel mundial los fungicidas más utilizados para prevenir la diseminación de esporas y controlar la enfermedad son: captan, dicarboximidas, benzimidazoles e IBE. En el Ecuador se utilizan otros principios activos como el Fludioxinil, Ciprodinil, Tiabenzanol, Iprodione, Propiconazole y Carbendazim (Tabla 2) [9].

El objetivo de esta investigación fue determinar *in vitro* la eficacia de cinco fungicidas: Rovral, Tilt, Mertec, Bravo y Switch (Tabla 2), utilizados en el control de la podredumbre morena, identificando la dosis letal media (EC_{50}) de cada uno de ellos en tres muestras de *Monilinia spp.* de la Sierra Ecuatoriana. Esto ayudará a diseñar de manera eficiente las estrategias de control del hongo, especialmente en la elección del fungicida a ser utilizado y la dosificación de las aplicaciones, contribuyendo de esta manera a reducir los costos y el impacto sobre el ambiente.

Provincia	Total de Muestras Colectadas	Muestras positivas Identificación Morfológica
Carchi	4	3
Imbabura	9	7
Pichincha	7	5
Tungurahua	14	6
Total	34	21

Tabla 1: Número de muestras colectadas e identificadas como *Monilinia* en cada provincia. Se presenta el total de muestras colectadas en cada provincia y el número de aislamientos identificados como *Monilinia spp.* mediante observación morfológica.

Producto	Principio Activo	Tipo de Fungicida
Mertec	Tiabendazol	Sistemático
Tilt	Propiconazole	Sistemático
Switch	Fludioxinil	Sistemático y Contacto
Bravo	Cloratalonil	Contacto
Rovral	Iprodione	Contacto

Tabla 2: Fungicidas utilizados para determinar *in vitro* la efectividad de su principio activo contra *Monilinia*. Se indica el principio activo de cada producto y el tipo de fungicida.

Materiales y métodos

Material Vegetal

El material biológico fue colectado en 34 localidades del Ecuador (Tabla 1). En cada plantación se colectaron entre 1 y 8 frutos de durazno que presentaban sintomatología típica de la enfermedad, algunos con indicios de infección y otros completamente momificados. Los frutos momificados, fueron colectados tanto del suelo como de las ramas del árbol. Adicionalmente, se compraron frutos de durazno con indicios de la sintomatología en 5 mercados: 3 en Tungurahua y 2 en Imbabura. Todas las muestras fueron colocadas individualmente en recipientes de plástico con tapa para su transporte al laboratorio. La colección se realizó entre febrero y julio de 2010.

El aislamiento del hongo y la evaluación *in vitro* de fungicidas fueron realizados en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. La nomenclatura usada, para identificar las muestras colectadas y posteriormente los aislamientos, corresponde a un código formado por la inicial de la provincia de procedencia, seguida de un número ordinal de colección (ejemplo: C01, corresponde al primer aislamiento colectado en Carchi).

Para la evaluación *in vitro* de fungicidas se escogieron los tres aislamientos que presentaron mayor tasa de esporulación, ya que a partir de éstos se pudo obtener más fácilmente cultivos monospóricos. Además por cuestiones logísticas fue importante no aumentar el número de muestras ya que cada una fue testeada con cinco fungicidas y tres réplicas. Entonces, se trabajó con un aislamiento de Tungurahua (T04) ya que esta provincia es el centro tradicional de cultivo de durazno en el país y con

dos muestras del norte de la Sierra Ecuatoriana, Carchi (C03) e Imbabura (I03), donde actualmente el cultivo de este frutal se ha expandido.

Aislamiento de *Monilinia*

Dentro de una cámara de flujo laminar (Thermo Forma), se realizó el aislamiento del hongo de dos formas diferentes, dependiendo del estado de afectación del fruto. Los frutos que presentaban sintomatología leve de la enfermedad fueron desinfectados externamente, siguiendo la metodología estandarizada previamente en el laboratorio [9, 10]. Brevemente, se lavó los frutos de durazno con agua de la llave, se obtuvo segmentos rectangulares del pericarpio de manera que una mitad estuviera afectada por el hongo y la otra sana, se sumergió los segmentos en agua destilada estéril por 30 segundos, posteriormente se los mantuvo en hipoclorito de sodio 2.5 % por 30 segundos, se los lavó en agua estéril, y se los secó en papel absorbente autoclavado. Luego se los colocó en medio de cultivo V8-MA [8] y se incubó a 25°C por 4 días en oscuridad. Posteriormente se hizo varias rondas de purificación mediante subcultivos hasta obtener colonias típicas de *Monilinia*. En el caso de los frutos momificados se los colocó en cámaras húmedas y se los incubó a 25°C, entre 4 y 6 días, para inducir esporulación del hongo sobre la superficie de la fruta momificada. Las esporas que crecieron fueron sembradas en medio de cultivo V8-MA e incubadas 4 días a 25°C en oscuridad.

Identificación de *Monilinia* spp.

Tanto el micelio como las esporas fueron observados al microscopio óptico mediante tinción con azul de metileno. Los aislamientos que presentaban esporas características de *Monilinia* por su forma (conidios de forma ovoide truncados en sus extremos), tamaño (12–16 x 8–11 μm) y disposición ramificada en los cuerpos fructíferos del hongo y que además mostraban el micelio con un aspecto y coloración propios del hongo (coloración de micelio gris o crema) [11, 12] fueron conservados en medio V8-MA y PDA. Se realizaron subcultivos cada tres semanas para mantener el material viable y posteriormente realizar cultivos monospóricos.

Adicionalmente se realizó una confirmación de los aislamientos escogidos para la evaluación, mediante marcadores SCAR y regiones ITS, utilizando protocolos previamente estandarizados en el laboratorio [10].

Preparación de cultivos monospóricos

Con el propósito de contar con un cultivo homogéneo del hongo para evaluar su respuesta a los fungicidas en estudio, se procedió a realizar cultivos monospóricos de cada aislamiento.

Los 21 aislamientos del hongo identificados como *Monilinia* spp. fueron sometidos a continuos subcultivos en medio V8-MA (3-5 veces) para inducir mayor esporulación. Los tres aislamientos que presentaban abundante

esporulación fueron utilizadas para realizar los cultivos monospóricos.

Se colocó las cajas que contenían el hongo dentro de la cámara de flujo laminar y se añadió 5000 μl de agua destilada estéril, con el fin de resuspender las esporas en el líquido. Paralelamente, se colocaron 900 μl de agua destilada estéril en 6 tubos eppendorf de 1,5 uL, para realizar diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . Para esto se tomó con una micropipeta 100 μl de cada caja de Petri que contenía esporas en suspensión y se añadió en el primer tubo de 10^{-1} , luego se tomó 100 μl de esta última solución y se transfirió este volumen al tubo eppendorf de 10^{-2} y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-6} . Se sembró 50 μl de cada dilución de esporas en una caja de Petri diferente con medio V8-MA, distribuyéndola uniformemente con un asa de vidrio previamente flameada. Las cajas así tratadas se incubaron a 25°C por 7 días. Las colonias que provenían de esporas individuales y que habían tenido un crecimiento independiente, fueron sembradas individualmente en nuevas cajas de Petri con medio V8-MA e incubadas bajo las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente.

Determinación *in vitro* del EC_{50} de cinco fungicidas para el control de *Monilinia*

A fin de establecer una ecuación de regresión que permita derivar los valores de EC_{50} para cada uno de los fungicidas en estudio (Tilt, Bravo, Mertect, Switch, y Rovral) (Tabla 2), se preparó cuatro concentraciones (1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) más el control (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de los cinco fungicidas en medio de cultivo V8-MA [13]. Se distribuyó 20 ml del medio preparado en cada caja de Petri. Se usó tres aislamientos de *Monilinia*, de las provincias de Tungurahua (T04), Imbabura (I03) y Carchi (C03). Se realizaron tres repeticiones por cada concentración de fungicida. Con la cámara de Neubauer se ajustó la concentración de la solución de esporas de los aislamientos de *Monilinia* a 10^5 esporas/ml y se sembró 100 μl en cada caja [14]. Finalmente, las cajas fueron incubadas a 25°C. Al séptimo día se tomaron los datos de germinación usando un estereomicroscopio (Thomas Scientific) (40X), contando el número de esporas germinadas en tres campos ópticos en cada caja y luego se obtuvo el promedio de las tres lecturas.

Análisis de datos

Los datos de germinación de esporas fueron tomados en cada repetición para las diferentes concentraciones de fungicidas y luego fueron promediados y utilizados para obtener los valores logit (Logit = $\ln(p/(1-p))$), donde p = probabilidad [7], y con ellos establecer una ecuación de regresión lineal para derivar el valor EC_{50} de cada fungicida en cada uno de los aislamientos de *Monilinia* analizados.

Resultados y Discusión

Colección de frutos infectados y aislamiento del hongo

Se colectaron frutos de durazno que presentaban sintomatología de las primeras fases de infección causada por *Monilinia*, así como frutos momificados, en 34 localidades de cuatro provincias: 4 en Carchi, 9 en Imbabura, 7 en Pichincha y 14 en Tungurahua (Tabla 1). De estas muestras se obtuvieron 21 aislamientos que tenían las características descritas para el género *Monilinia* en las claves taxonómicas utilizadas [9, 10]. La eficiencia en el aislamiento de *Monilinia* a partir de frutos parcialmente infectados fue menor (32,35 %) comparado con el aislamiento del hongo proveniente de frutos momificados (53,8 %). Esto pudo deberse a que existen otros fitopatógenos como *Glomerella cingulata* que producen la misma sintomatología de *Monilinia fructicola* en las primeras etapas de la infección en el pericarpio del durazno (manchas café) [15], lo cual pudo haber causado confusión en el momento de la recolección. Por otro lado, se conoce que los frutos momificados constituyen el principal reservorio de conidios (fase asexual del hongo) [16]. Esto podría explicar por qué el porcentaje de eficiencia al aislar *Monilinia* fue mayor usando frutos momificados que frutos recientemente infectados. Otra observación fue que los frutos momificados de los cuales se pudo aislar *Monilinia* fueron los que se colectaron directamente de las ramas de los árboles y no de los que se recogieron del suelo, lo que sugiere que estos últimos pudieron haber estado contaminadas con otros hongos, lo que habría complicado el aislamiento de *Monilinia*, a pesar de que la literatura menciona que los frutos momificados mantienen los conidios de *Monilinia* viables por largos períodos [17].

Específicamente en la provincia de Tungurahua, la eficiencia de aislamiento del hongo fue más baja que en las otras provincias, lo cual se debió quizá a las condiciones ambientales en la época de muestreo (finales de febrero e inicios de marzo del año 2010) que no fueron favorables para el desarrollo de *Monilinia*, ya que la región soportó un periodo extenso de sequía, baja humedad y a esto se sumó la presencia de ceniza volcánica por la erupción del Volcán Tungurahua [18]. Este fitopatógeno se desarrolla en temperaturas que oscilan entre 20 y 25°C en el día y noches frescas, con requerimientos altos de humedad [7].

Determinación del EC₅₀ de los cinco fungicidas

El objetivo de este experimento fue determinar la concentración de fungicida a la cual el 50 % de las esporas del hongo estudiado dejaba de germinar (EC₅₀). Acogiendo la recomendación de Obanor y colaboradores [19], para este estudio se consideró que el valor EC₅₀ <1 µg/ml correspondía a un fungicida efectivo para el control del patógeno.

En cada concentración (1, 10, 100 y 1000 µg/ml) de fungicida se sembró 100 ul de una solución de 10⁵ esporas/ml de cada aislamiento. El número de esporas que

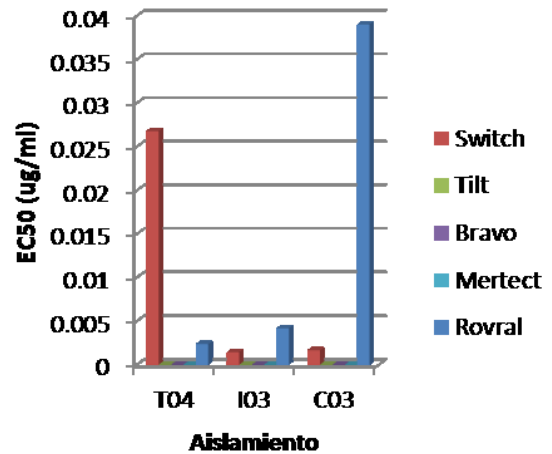


Figura 1: Concentración efectiva (µg/ml) de los cinco fungicidas utilizados donde el 50 % de las esporas dejan de germinar (EC₅₀) utilizando los tres distintos aislamientos de *Monilinia*: T04 (Tungurahua), I03 (Imbabura) y C03 (Carchi).

germinaron en las cuatro concentraciones de los cinco fungicidas se registró al tercero, quinto y séptimo días, pero para el análisis solo se tomaron en cuenta los datos que corresponden al día séptimo, debido a que la mayoría de aislamientos tuvo un crecimiento evidente en este tiempo.

Se esperaba que los fungicidas más efectivos fueran Bravo (Clorotalonil), Rovral (Iprodione) y Tilt (Propiconazole), porque en un estudio realizado por Adaskaveg y sus colaboradores [20], se encontró que los principios activos más efectivos para el control de la podredumbre parda eran el IBE (Inhibidores de Biosíntesis del Ergosterol), el captan, los dicarboximidas, los triazoles y los benzimidazoles. Estos principios activos corresponden al mismo grupo químico al que pertenecen los principios activos probados en este estudio. Los fungicidas que mejores resultados mostraron para controlar la germinación de esporas de *Monilinia* fueron Tilt, Bravo y Mertec (Figura 1).

El fungicida Tilt no es específico para el control de *Monilinia* pero su uso ha aumentado en los últimos años en las plantaciones de durazno en el Ecuador (Tobar José, comunicación personal). El principio activo de Tilt es el Propiconazole que proviene del mismo grupo químico de los triazoles [19]. Se determinó que el Propiconazole al tener un EC₅₀ menor a $1,15 \times 10^{-5}$ µg/ml es muy efectivo inhibiendo la germinación de esporas de *Monilinia*, los resultados son similares a los descritos en estudios con *Phaeoconiella chlamydospora*, en donde los triazoles obtuvieron un valor menor a 0,3 µg/ml [21].

El fungicida Bravo es específico para el control de *Monilinia* [22]. El principio activo de este fungicida es el clorotalonil, el cual fue efectivo previniendo la germinación de las esporas aisladas de *Monilinia* con un EC₅₀ menor a $1,14 \times 10^{-5}$ µg/ml. Para el control de *Spilocoaea oleagina*, en Nueva Zelanda, se encontró que el EC₅₀ del clorotalonil fue menor a 0,06 µg/ml [19]. Estos resultados muestran que el principio activo del fungicida

Bravo es de amplio espectro, a pesar de que se lo use específicamente para inhibir el crecimiento de *Monilinia*. El clorotalonil tiene la capacidad de intervenir en la síntesis de las enzimas provocando que el hongo no se desarrolle y muera [23].

Mertect es un fungicida sistémico y su principio activo es el tiabendazol, el mismo que pertenece al grupo químico de los benzimidazoles. El valor EC_{50} usando este fungicida fue menor a $1,19 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$. Existen otros estudios que reportan valores similares para *Sclerotinia homeocarpa* y *Botrytis cinerea* [24, 25]. La efectividad del tiabendazol puede deberse a que es un fungicida relativamente nuevo en el mercado ecuatoriano, y se lo utiliza muy poco para la fumigación de los cultivos de durazno (José Tobar, comunicación personal).

Con el fungicida Rovral, las esporas de los tres aislamientos utilizados (Imbabura, Carchi y Tungurahua) germinaron hasta una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$, y el EC_{50} fue menor a 4×10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ (Figura 1). En otros estudios, realizados con diferentes fitopatógenos de interés agronómico como *Sclerotinia homoeocarpa* y *Botrytis cinerea*, en donde se evaluó al principio activo de este fungicida Rovral, (dicarboximidas), se encontraron valores de sensibilidad parecidos a los obtenidos en este estudio con *Monilinia* [24, 25, 26, 27, 28].

En el Ecuador el fungicida Switch no es utilizado mayormente para inhibir la germinación de *Monilinia*, se lo usa más para control de *Botrytis* [22]. Se sabe que este fungicida se lo aplica para hacer lavados de postcosecha (José Tobar, comunicación personal). A pesar que es un fungicida usado para otro tipo de hongo se pudo determinar que si es un fungicida eficaz para inhibir el crecimiento de *Monilinia*.

Tanto Switch como Rovral no mostraron mayor eficiencia comparados con Mertect, Bravo y Tilt, porque las esporas de los tres aislamientos de *Monilinia* germinaron a una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$ y su EC_{50} fue menor a $2,8 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$. Los valores obtenidos en este estudio se parecen a los de Hilber y Schuepp, donde se estudió la susceptibilidad de *Botrytis* hacia el fungicida Switch [25].

Al realizar las pruebas de germinación de esporas de los aislamientos de *Monilinia* en las diferentes concentraciones de fungicidas se pudo determinar que los fungicidas utilizados en este experimento resultaron ser eficaces para inhibir la germinación de esporas de *Monilinia*, llegando a tener EC_{50} menores a $0,01 \mu\text{g/ml}$ (Figura 1) en los aislamientos utilizados para la evaluación. Los fungicidas más efectivos para el control de *Monilinia* fueron Mertect, Bravo y Tilt, pues inhibieron la germinación de esporas en concentraciones sumamente bajas en los tres aislamientos utilizados.

Es importante que se aumente el número de muestras y se realicen pruebas de campo para evaluar el EC_{50} de estos fungicidas y corroborar los resultados obtenidos en este estudio, ya que la eficiencia de estos productos

puede variar por factores externos como el viento, temperaturas, humedad e insectos [24, 25].

Este estudio es una base para establecer estrategias efectivas de control para la podredumbre morena en los cultivos de durazno del país, al igual que retardar el apareamiento de resistencias a los fungicidas que se están utilizando actualmente.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Programa “Small Grants”, Universidad San Francisco de Quito.

Los autores agradecen a Carlos Ruales por su apoyo en la identificación morfológica de *Monilinia spp.* A Bernardo Gutiérrez por la edición de este manuscrito especialmente en la redacción del resumen en inglés, y a todo el grupo de investigación del Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Referencias

- [1] Layne, D. and Bassi, D. 2008. “*The Peach: Botany, production and uses*”, Biddles: King’s Lynn.
- [2] Whealy, K., Vásquez, W., and Viteri, P. 2001. “*Fruit berry and nut inventory*”, Third edition. United States.
- [3] USDA: Foreign Agricultural Service. 2010. “Global agricultural information network”. 2010-05-10. Consultado: 2010-11-06. <<http://gain.fas.usda.gov>>.
- [4] SIGAGRO 2010. *Ministerio de Agricultura, Ganadería Acuicultura y Pesca, MAGAP*.
- [5] Agrios, G. 1995. “*Fitopatología*”, Segunda Edición. Uteha Noriega Editores: México.
- [6] Coté, M., Tardif, M., and Meldrum, A. 2004. “Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* and *Monilinia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR”. *Plant Disease*. 88, 1219 – 1225.
- [7] Thomson, W. 1994. “*Agricultural Chemical Book IV-fungicides*”, Fresno.
- [8] Gregorí, B. 2005. “Estructura y actividad de los antifúngicos. instituto cubado de investigaciones de derivados de la caña de azúcar”. *Rev. Cubana Farm.* 39(2).
- [9] Borja, E. 2011. “Evaluación in vitro de fungicidas para el control de *Monilinia spp.* aislada de duraznos (*Prunus persica*) de diferentes localidades de la sierra del Ecuador”. *Universidad San Francisco de Quito, Tesis de Ingeniería: Quito*.
- [10] Salgado, C. 2011. “Identificación molecular de especies de *Monilinia spp.* que afectan la producción de durazno, *Prunus persica*, en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua”. *Universidad San Francisco de Quito, Tesis de Licenciatura: Quito*.
- [11] EPPO 2009. *Diagnostic Protocol of Monilinia fructicola*, European and Mediterranean Plant Protection Organization.
- [12] Streets, R. 1982. “*The diagnosis of plant diseases*”, Tucson: The University of Arizona.

- [13] Cañedo, V. and Ames, T. 2004. "Medios de cultivos de laboratorio: Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entompatógenos". *Perú: Centro Internacional de la papa (CIP)*. pp. 18 – 22.
- [14] Everett, K. and Torrevilla, O. 2007. "In vitro fungicide testing for control of avocado fruit rots". *New Zealand Plant Protection*. 60, 99 – 103.
- [15] Hartman, J. 2007. "Peach fruit diseases". *Plant Pathology Fact Sheet: University of Kentucky, College of Agriculture*.
- [16] Gell, I., Cubero, J., and Melgarejo, P. 2007. "Two different pcr approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees". *Journal of Applied Microbiology*. pp. 1364 – 5072.
- [17] Mitidieri, M., Constantino, A., Brambilla, J., Gabilondo, E., Parra, M., Veron, R., and Bimboni, G. 2005. "Effect of different early/season sprays on blossom blight incidence and yield in peach orchards". *Acta Horticulturae 713: VI International Peach Symposium*.
- [18] INAMHI, boletín anual 2010.
- [19] Obonor, F., Walter, M., Jones, E., and Jaspers, M. 2005. "In vitro effects of fungicides on conidium germination of *Spilocaea oleagina*, the cause of olive leaf spot". *New Zealand Plant Pathology Protection Society*. 58, 278 – 282.
- [20] Adaskaveg, J., Foster, H., Gubler, W., Teviotdale, B., and Thompson, D. 2005. "Reduced-risk fungicides help manage brown rot and other fungal disease of stone fruit". *California agriculture*. 59, 109 – 114.
- [21] Jaspers, M. 2001. "Sensitivity of phaeomoniella chlamydospora to fungicides in vitro". *New Zealand Plant Protection Society, Horticultural Pathology*. 54, 225 – 228.
- [22] Burpee, L. 1997. "Control of dollar spot of creeping bentgrass caused by an isolate of *Sclerotinia homeocarpa* resistant to benzimidazole and the demethylation-inhibitor fungicides". *Plant Disease*. 81, 1259 – 1263.
- [23] Thomson, W. 1997. "Agricultural Chemicals. Book IV: Fungicides", Thomson Publications, Fresno, CA., 12 edition.
- [24] Grindle, M. 1981. "Variations among field isolates of *Botrytis cinerea* in their sensitivity to antifungal compounds". *Pesticide Science*. 12, 305 – 312.
- [25] Hermann, D. and Gisi, U. 1994. "Cross-resistance among dmi fungicides and sensitivity distributions of *Septoria tritici* populations". *Brighton Crop Prot. Conf. - Pests and Diseases*. 1, 487 – 492.
- [26] Liggit, J., Jenkinson, P., and Parry, D. 1997. "The role of saprophytic microflora in the development of fusarium ear blight of winter wheat caused by *Fusarium*".
- [27] Hilber, U. and Schuepp, H. 1996. "A reliable method for testing sensitivity to *Botryotinia fuckeliana* to anilopyrimidines in vitro". *Pesticide Science*. 47, 241 – 247.
- [28] Parker, K. and Sutton, T. 1993. "Effect of temperature and wetness duration on apple fruit infection and eradicant activity of fungicides against *Botryosphaeria dothidea*". *Plant Disease*. 77, 181 – 185.