

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Monilinia* spp., EN AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE *Prunus* spp. POR PCR CON *PRIMERS* ESPECÍFICOS

Malvárez, G.¹, Rodríguez, A.¹, Aguilar, C.¹, Silvera, E.² y Mondino, P.².

Recibido: 30/04/01 Aceptado:02/08/01

RESUMEN

La podredumbre morena causada por *Monilinia* sp es la enfermedad fúngica más importante que afecta al cultivo de duraznero (*Prunus* sp.). Existen tres especies: *Monilinia fructigena*, *M. fructicola* y *M. laxa*. En Uruguay están reportadas las dos últimas. No obstante, la identificación de las especies es un tema muy complejo. Es necesario conocer qué especies se encuentran presentes, cuál es su distribución y qué rol juegan en la producción de atizonado de flores y podredumbre de frutos. Para ello este trabajo se planteó evaluar un método para identificar de forma inequívoca las especies que atacan al cultivo en el país. Los aislamientos obtenidos a partir de frutos infectados fueron caracterizados por medio de la técnica de PCR con los *primers* MO368-5, MO368-10R, MO368-8R, MO368-12R, que usados en una única reacción permiten distinguir las 3 especies dependiendo del tamaño del producto de amplificación obtenido. La técnica resultó ser efectiva, amplificando diferencialmente las tres especies. A pesar de las diferencias culturales (carácter utilizado para la diferenciación de las tres especies), todos los aislamientos analizados, resultaron ser *M. fructicola* independientemente de la variedad de durazno a partir de la cual fue realizado el aislamiento o del monte donde se obtuvo la fruta.

PALABRAS CLAVE: *Monilinia*, *M. laxa*, *M. fructicola*, *M. fructigena*, PCR.

SUMMARY

IDENTIFICATION OF *Monilinia* spp. IN *Prunus* spp. BY PCR WITH SPECIFIC *PRIMERS*

The brown rot disease caused by *Monilinia* sp is the most important fungal disease in peach (*Prunus* sp). There are three species: *M. fructigena*, *M. fructicola* and *M. laxa*. In Uruguay, only two of them have been reported. The identification of the species is a very complex subject. It's necessary to know which are the species present, their distribution and their incidence in flower blight and fruit rotting. In order to achieve this, the present research's aim was to evaluate a method to identify in a precise way the species attacking peach in our country. The isolates from infected fruit were characterized through PCR with specific primers (MO368-5, MO368-8R, MO368-10R, MO368-12R). These primers used in a single reaction allow to distinguish among the three species depending on the size of the amplification product obtained. The technique proved to be effective, amplifying differentially the three species. Despite the cultural differences (character used to separate the three species), all the isolates analyzed, were *M. fructicola* independently of the peach variety or the collection place.

KEY WORDS: *Monilinia*, *M. laxa*, *M. fructicola*, *M. fructigena*, PCR.

¹ Cátedra de Microbiología, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía Garzón 780 Montevideo - Uruguay, CP - 12 900. e-mail: gabriela@fagro.edu.uy

² Cátedra de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía Garzón 780 Montevideo - Uruguay, CP - 12 900.

INTRODUCCIÓN

La producción de duraznos (*Prunus persica*) en Uruguay ocupa un área de 3.047 hás., representando el 35,6 % de la producción de frutales de hoja caduca (DIEA-MGAP 1999).

La podredumbre morena causada por *Monilinia* sp. es la enfermedad fúngica más importante que afecta al cultivo produciendo atizonado de flores, muerte de ramas y podredumbre de fruta. Es el principal problema en la post-cosecha pudiendo provocar pérdidas de hasta el 100 % (Tálice *et al.*, 1970; Snowdon 1990). Es una enfermedad de difícil control cuando ocurren condiciones favorables.

En el mundo se han identificado tres especies de *Monilinia*: *M. fructicola*, *M. fructigena* y *M. laxa*. Una diferencia importante entre ellas es el hecho de que *M. fructigena* incluye entre sus hospederos al manzano (*Malus pumila*) mientras que las restantes solamente afectan *Prunus* spp. Una segunda diferencia, de importancia epidemiológica, es que *M. laxa* afecta preferentemente las flores mientras que *M. fructicola* tiene mayor incidencia sobre los frutos. (Byrde y Willetts, 1977).

En Uruguay han sido citadas las tres especies en enumeraciones de patógenos sin hacer referencias a la metodología utilizada para su identificación. (Herter, 1933; Bertelli y Carrión, 1941; Koch y Boaso, 1955 a, b; Koch *et al.*, 1981)

Hasta el presente la identificación de las especies de *Monilinia* se basó en características culturales y morfológicas, los procedimientos son lentos y la identificación puede ser no conclusiva (Fulton y Brown, 1997, van Leeuwen, y van Kesteren, 1998).

En estudios epidemiológicos recientes realizados por la Cátedra de Fitopatología (Facultad de Agronomía) (datos no publicados) se utilizaron métodos de identificación basados en características morfológicas y culturales. Los métodos utilizados fueron: morfología de colonias, tamaño de los conidios, ramificación de los tubos germinativos, desarrollo sobre peras verdes maduras (Byrde y Willetts, 1977). De esta manera se identificaron aislamientos con las características típicas de *Monilinia fructicola* y de *Monilinia laxa*. Uno de estos aislamientos, A31, identificado como *M. laxa* por todos los métodos utilizados, fue seleccionado como referencia para realizar una prospección de las especies presentes en la zona de producción mediante el método de interacción de micelios creciendo en medio Agar Avena (AA) (Sonoda *et al.*, 1982) y en trabajos posteriores de control biológico (Leites *et al.*, 1998).

La interacción del aislamiento A31 con los aislamientos provenientes del muestreo dio como resultado la aparición de líneas de interacción diferentes a las esperadas, no lográndose una identificación concluyente de las espe-

cies. A partir de estos resultados un grupo de 15 aislamientos (incluyendo el A31) fueron enviados al laboratorio de la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos (Canadian Food Inspection Agency, CFIA). para verificar su identificación por métodos moleculares.

Todos los aislamientos enviados fueron caracterizados como *M. fructicola* (Coté, com. pers) en contraposición a los resultados obtenidos hasta el momento, evidenciando la necesidad de contar con una herramienta confiable, sensible y rápida que permita diferenciar entre las especies de *Monilinia*.

El advenimiento de la biología molecular en general y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en particular, ha facilitado enormemente el análisis de microorganismos, aportando una capacidad superior para caracterizar y clasificar cepas y facilitar el estudio la diversidad genética de poblaciones (Lows *et al.*, 1999). Los marcadores genéticos, particularmente aquellos basados en el ADN, son una herramienta útil para determinar la diversidad genética entre individuos. Estudios como los RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) (Lanfranco *et al.*, 1993; Tommerup *et al.*, 1995), amplificación del ADN ribosomal (Henrion *et al.*, 1992, 1994), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Armstrong *et al.*, 1989), AFLP (Amplified fragment Length polymorphism) (Majer *et al.*, 1996) microsatélites (Sastry *et al.*, 1995) y otros tipos de marcadores basados en ADN se han convertido en populares para este propósito.

El factor clave de la aplicación de la técnica de PCR para la caracterización de microorganismos y hongos en particular es la determinación de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) específicos para la identificación de los límites del sitio a amplificar. Usando *primers* adecuados, pueden ser estudiados diferentes aspectos en diferentes niveles taxonómicos (Nylund *et al.*, 1995). El taxón o especie seleccionado puede ser también caracterizado o identificado en materiales mixtos como el caso de hongos fitopatógenos o los simbióticos (micorrízicos) donde el hongo y el material vegetal están mezclados (Gardes y Bruns, 1993; Egger, 1995).

Para el caso específico de *Monilinia* sp. han sido utilizados algunos de estos métodos como ser la amplificación con *primers* específicos para una de las tres especies, *M. fructicola* (Fulton y Brown, 1997; Forster y Adaskaveg, 1999). Este método permite determinar si un aislamiento es *M. fructicola* cuando hay un producto de amplificación o si no lo es, cuando el resultado es negativo (no hay amplificación). Por otro lado, y con un espectro mayor de aplicaciones, está la utilización de *primers* específicos para cada una de las especies, lo cual permite determinar si un aislamiento pertenece al género *Monilinia* o

no y a la vez determinar a cuál de las tres especies pertenece (Coté, com. pers).

El objetivo del presente trabajo fue el ajuste y evaluación de este último método, PCR con *primers* específicos, para la caracterización de aislamientos de *Monilinia* provenientes de frutos de durazno infectados, para contar con una herramienta rápida y precisa para estudios epidemiológicos de la enfermedad en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la caracterización de las especies de *Monilinia* sp. el hongo fue aislado a partir de frutos con indicios de infección por *Monilinia* o de frutos momificados obtenidos de montes de duraznero de la zona de Melilla. Se realizaron aislamientos a partir de frutos de diferentes variedades de durazno y nectarines (Cuadro 1). El hongo fue aislado en medio Agar Malta Acidificado (2% Extracto de Malta, 2% Agar, pH 4.5, Streptomycin 0,2mg/ml) y repicado a medio PDA (Potato Dextrose Agar). Como control se utilizaron cultivos de cepas de colecciones internacionales (Cuadro 2) de cada una de las tres especies. Los cultivos de las cepas de colección fueron cedidos por la Dra.

Cuadro 1. Aislamientos de *Monilinia* obtenidos de *Prunus* spp de la zona de Melilla.

Código	Variedad	Monte	Nº de aislamientos
MB	June gold	Arocena	18
		Solari	3
		Mori	7
		Gastaldi	19
		Rambal	14
		Mauro	10
MD	Rey del Monte	Mori	14
		Rambal	13
MF	Pavia	Rambal	19
		Borga	22
		Arocena	34
		Solari	27
MK	Flor da King	Moisso	19
MN	No determinada	Rambal	15
MP	Pelón	Perasa	13
MS	San Francisco	Perasa	11
MX	Dixiland	RedyAr	9
		Borga	23
MM	Bruneto	Matrelli	15
		Briano	7
Total			312

Cuadro 2. Aislamientos de colecciones internacionales de las tres especies de *Monilinia* utilizados como controles para la identificación de las especies.

Especie	Nomenclatura
<i>M. fructicola</i>	DAOM 208467
<i>M. fructicola</i>	DAOM 208461
<i>M. fructicola</i>	CBS 203.25
<i>M. fructigena</i>	CBS 494.50
<i>M. fructigena</i>	CBS 231.57
<i>M. fructigena</i>	ATCC 38358
<i>M. laxa</i>	ATCC 9961
<i>M. laxa</i>	CBS 5488.50
<i>M. laxa</i>	CBS 202.25

M.J. Coté de la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos (CFI A).

Extracción de ADN

Las extracciones de ADN fueron realizadas a partir del micelio de una placa de 7 días de crecimiento (crecimiento sobre el total de la placa). La extracción se realizó según el método de Paoloci et al. (1999) con algunas modificaciones. El mismo consistió en una maceración del material e incubación en buffer de lisis (200mM Tris HCl, pH 7,5; 250mM NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS) a 65°C durante 30 minutos. Posterior a la incubación fue centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm. Para la precipitación del ADN fue utilizado isopropanol, a -20°C durante 30 minutos y nuevamente centrifugado a 10000 rpm, por 5 minutos. El ADN fue resuspendido en 50 ml de buffer TE (10mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8).

Para comprobar la presencia de ADN, las muestras fueron corridas en gel de agarosa 1%, con 0,3 mg de bromuro de etidio/ml. Para ajustar la cantidad de ADN a utilizar en la reacción de amplificación, el ADN extraído fue cuantificado en espectrofotómetro a 260 nm (DO = 1 equivale aproximadamente a 50 mg de ADN doble hebra).

Amplificación

Para la reacción de amplificación (PCR), fueron utilizados los *primers* específicos para cada una de las tres especies de *Monilinia*: MO368-8R (*M. fructigena*), MO368-10R (*M. fructicola*) y MO368-12 (*M. laxa*) en combinación con el *primer* MO368-5, común a las tres especies. (Coté, com. pers). Las secuencias de los *primers* son las siguientes:

MO368-8R: 5'-AGATCAAACATCGTCCATCT-3'
 MO368-10R: 5'-AAGATTGTCACCATGGTTGA-3'
 MO368-12: 5'-GACTGCAATCCACACCGTCG-3'
 MO368-5: 5'-GCAAGGTGTCAAAACTTCCA-3'

Las condiciones de la reacción fueron: buffer 1x, nucleótidos 0,2 mM; MgCl₂ 2,5mM; *primers* 0,1 mM de cada uno; BSA 0,5 mg/ml, Taq polimerasa 0,5 U (GIBCO-BRLâ).

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes:

95 °C por 30 segundos, 60°C por 60 segundos, 72 °C por 30 segundos durante 5 ciclos. Y 95 °C por 30 segundos, 58°C por 60 segundos 72 °C por 30 segundos durante 35 ciclos con una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Los productos de la reacción fueron corridos en gel de agarosa 1,5% (0,3mg de bromuro de etidio/ml) para determinar, según el tamaño de la banda obtenido a cuál de las especies correspondía cada muestra. Los tamaños esperados de banda son: 534bp para *M. fructicola*, 400pb *M. fructigena* y 333 pb para *M. laxa*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica de identificación de las diferentes especies de *Monilinia* con *primers* específicos resultó ser efectiva, amplificando diferencialmente las tres especies. Los resultados de la reacción de amplificación permiten distinguir claramente entre las tres especies de *Monilinia* según el tamaño del producto obtenido. En la Figura 1 pueden observarse las diferencias en el tamaño de la banda según sea la especie, 534bp para *M. fructicola*, 400pb *M. fructigena* y 333 pb para *M. Laxa* en este caso para cepas de colección.

Entre los más de 300 aislamientos obtenidos para la zona de Melilla, se presentaron diferentes morfologías de colonia en PDA. En la Figura 2 se presentan algunas de las morfologías más frecuentes.

A pesar de las diferencias en las morfologías (carácter utilizado para la diferenciación de las tres especies), todos los aislamientos analizados, resultaron ser *M. fructicola* independientemente de la variedad de durazno a partir de la cual fue realizado el aislamiento o del monte donde se obtuvo la fruta.

En la Figura 3 se muestra el resultado de la amplificación del ADN de los aislamientos representados en la Foto 2 como morfologías representativas de las encontradas. Puede observarse que todos los aislamientos (carriles 5 a 10) son *M. fructicola* al tiempo que se corrobora la especificidad de la técnica con los productos de amplificación obtenidos para las cepas de colección (carriles 2 a 4).

El hecho de poder utilizar todos los *primers* en la misma reacción potencia la utilidad de la técnica. El uso de estos *primers* especie específicos en una única reacción de amplificación se presenta como una técnica simple y precisa para la identificación de las tres especies y presenta sus ventajas frente a otros métodos utilizados como ser la amplificación de la región ITS (*Internal Transcribe Spacer*) del rDNA y posterior digestión con enzimas de restricción como la realizada para hongos micorrízicos en cultivo o en simbiosis con vegetales (Malvárez, 1999). A pesar de que las especies pueden ser determinadas por ambos procesos, una única reacción presenta ventajas en cuanto a tiempo y costo.

Respecto al uso de *primers* específicos se han realizado otras experiencias. Tal es el trabajo realizado por Fulton y Brown (1997) que diseñaron *primers* que amplifican, diferencialmente *M. fructicola* (no amplificando las otras especies). Los *primers* mfs-3 y NS5 amplifican un fragmento de 444 pb correspondiente al intron I de la región 18S

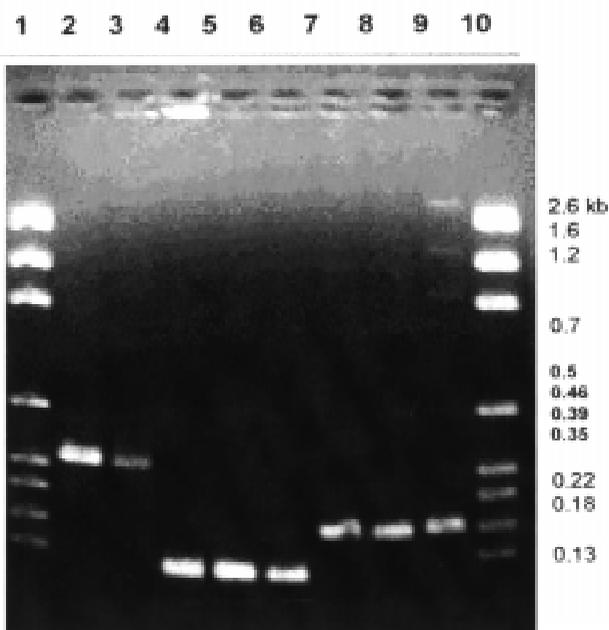


Figura 1. Foto de la corrida electroforética en gel de agarosa de los productos de PCR de la reacción con los *primers* MO368-5 en combinación con MO368-10R y MO368-12R para la cepas de colección.. Carril 1 y 10: marcador de peso molecular pGem; carril 2: *M. fructicola* DAOM 208461, carril 3: *M. fructicola* DAOM 208467, carril 4: *M. laxa* CBS 202.25, carril 5: *M. laxa* ATCC 9961, carril 6: *M. laxa* CBS 5488.50, carril 7: *M. fructigena* CBS 494.50, carril 8: *M. fructigena* ATCC 38358, carril 9: *M. fructigena* CBS 231.57.

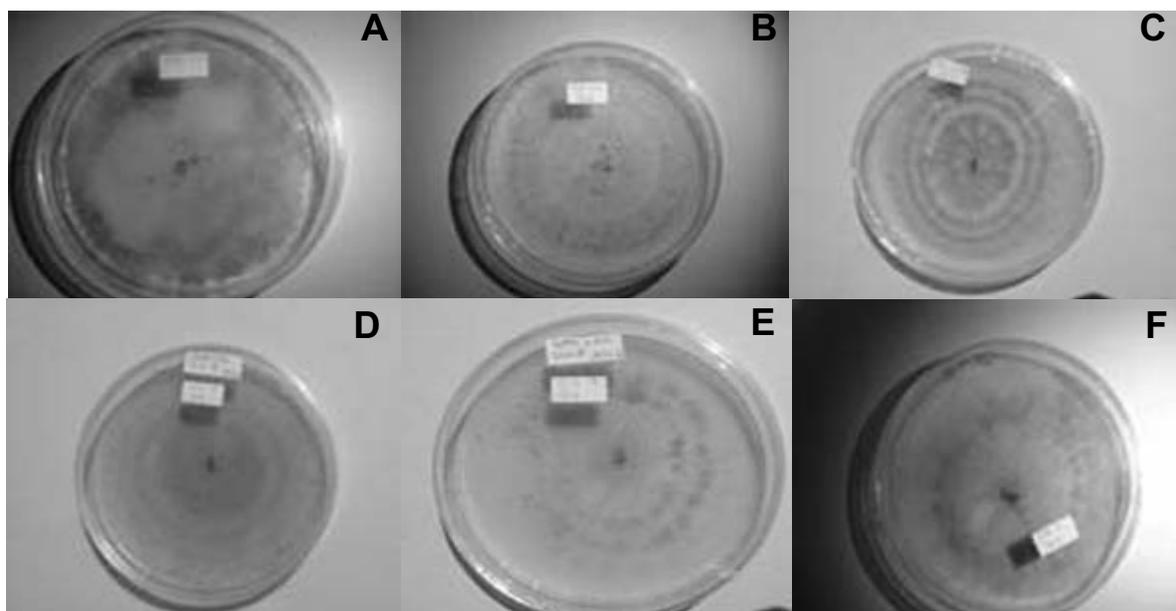


Figura 2. Aislamientos de *Monilinia* sp. crecidos en PDA. Parte superior: A: MB47; B: MD23; C: MD25. Parte inferior: D: MX5; E: MX8; F: MF3.

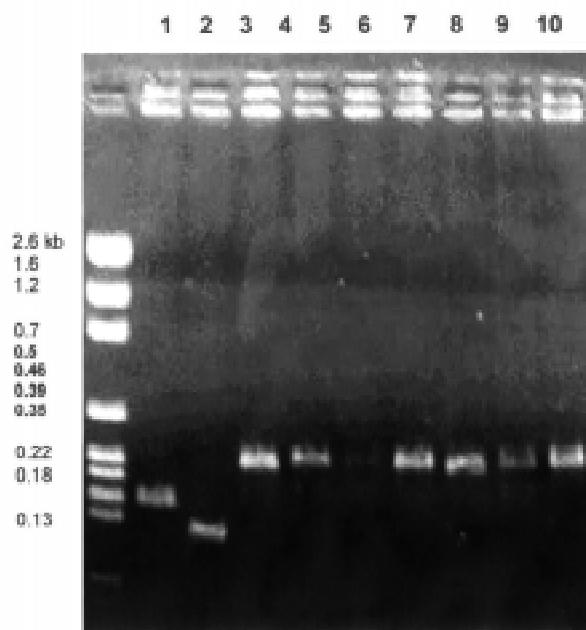


Figura 3. Foto de la corrida electroforética en gel de agarosa de los productos de PCR de la reacción con los *primers* MO368-5 en combinación con MO368-8R y MO368-12R para varios aislamientos de *Monilinia*. Carril 1: marcador de peso molecular pGem; carril 2: *M. fructigena* CBS 231.57, carril 3: *M. laxa* ATCC 9961, carril 4: *M. fructicola* CBS 203.25, carril 5: MF3, carril 6: MD23, carril 7: MD25, carril 8: MX5, carril 9: MX8 y carril 10: MB47.

más 26 pb adicionales. Estos *primers* amplificaron específicamente aislamientos de *M. fructicola*, siendo negativo el resultado para *M. laxa* y *M. fructigena*. Pero por otro lado, utilizando los mismos *primers*, Forster y Adaskaveg (1999), solo consiguieron resultados positivos en 7 de los 21 aislamientos de *M. fructicola* en estudio. Esto se debió a la variabilidad genética entre los aislamientos de *M. fructicola* consecuencia de la presencia o ausencia del intrón I en el rDNA lo cual fue confirmado por análisis de RAPD.

Para el presente trabajo, fueron analizados solo aislamientos procedentes de la zona de Melilla, a seguir serán analizados aislamientos procedentes de otras zonas frutícolas para confirmar la ausencia de *M. laxa* y *M. fructigena* en duraznero en nuestro país. Dado que la técnica ha demostrado ser suficientemente específica, amplificando solo el ADN fúngico y resultando productos de diferente tamaño según la especie en cuestión, en evaluaciones futuras se plantea aplicarla directamente sobre tejidos de la fruta con evidencia de infección, sin proceder al aislamiento y cultivo del hongo. En caso de lograrse este objetivo se podrá contar con una herramienta rápida y precisa que puede ser utilizada como control en fruta importada de países que presentan las tres especies del patógeno.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CSIC por la Financiación mediante el fondo para proyectos de Investigación y Desarrollo- 2000 y a la Dra. Marie José Coté del Canadian Food Inspection Agency cuyo grupo de trabajo diseñó los *primers* utilizados en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- ARMSTRONG, J.L.; FOWLES, N.L.; RYGIWICZ, P.T. 1989. Restriction fragment length polymorphisms distinguish ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil*. 116: 1-7
- EGGER, K. N. 1995. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Can. J. Bot.* 73:1415-1422.
- BERTELLI, J.C. Y MESA CARRIÓN, F. 1941. Enfermedades y plagas principales de la agricultura uruguaya. MGA. Cartilla N° 55.
- BYRDE, R.J.W.; WILLETTS, H.J. 1977. *The Brown Rot Fungi of Fruit. their biology and control.* Pergamon Press Ltda. Londres. 161 pp.
- FORSTER, H.; ADASKAVEG, J. E. 1999. Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology*. 90 (2): 171-178.
- FULTON, C.E.; BRON, A.E. 1997. Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. *FEMS Microbiology Letters*. 157: 307-312.
- GARDES, M.; BRUNS, T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes. Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- HENRION, B.; LE TACON, F.; MARTÍN, F. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol* 122: 289-298.
- HENRION, B.; CHEVALIER, G; MARTIN, F. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* 98: 37-43.
- HERTER, G. 1933. Estudios botánicos en la Región Uruguaya III. Flora uruguayensis. *Plantae avasculares*. 100p.
- KOCH DE BROTOS, L. Y BOASSO, C. 1955a. Lista de las enfermedades de los vegetales en el Uruguay. MGA. Publicación N° 106.
- KOCH DE BROTOS, L. Y BOASSO, C. 1955b. Lista de las enfermedades de los vegetales en el Uruguay. MGA. Publicación N° 106. Resumen en *The Review of Applied Mycology* 35:751.
- KOCH DE BROTOS, L., BOASSO, C., RICCIO DE MACHADO, O. Y GANDOLFO ANTÚNEZ, C. 1981. Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saporfitas en el Uruguay. MGAP. Informe técnico N°9.
- LEITES, L., MONDINO, P., Y BURGUEÑO, J. 1998 Efecto antagonico in vitro de *Penicillium rugulosum* sobre *Monilinia laxa*. Resumen en *Fitopatología* Vol. 33(1) p 35-36.
- LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJIN, F.J. 1999. The three Ds of PCR – Based Genomic Analysis of Phytobacteria: Diversity, Detection and Disease Diagnose. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:81-125.
- MAJER, D.; MITHEN, R.; LEWIS, B.G.; VOS, P.; OLIVER, R.P. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res* 100: 1107-1111.
- MALVÁREZ, G. 1999. Aplicação das metodologías PCR/RFLP para caracterização de fungos ectomicorrízicos em eucalipto. Tesis de Maestría. Florianópolis, SC. 80 pp.
- NYLUND, J.-E.; DAHLBERG, A.; HOGBERG, N.; KARÉN, O.; JONSSON, L. 1995. Methods for studying species composition of mycorrhizal fungal communities in ecological studies and environmental monitoring. IN: *Biotechnology of Ectomycorrhizae*. Stocchi et al (eds). New York: Plenum Press. pp 229-239.
- PAOLOCCI, F.; RUBINI, A.; GRANETTI, B.; ARCIONI, S. 1999. *FEMS Microbiology Ecology*. 28: 23-30
- SASTRY, J.G.; RAMAKRISHNA, W.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; THAKUR, R.P., GUPTA, V.S.; RANJEKAR, P.K. 1995. DNA fingerprinting detects genetic variability in the pearl millet downy mildew pathogen (*Sclerospora graminicola*) *Theor Appl Genet.* 91: 856-861.
- SNOWDON, A. 1990. A colour atlas of Post-harvest diseases & disorders of fruits & vegetables Vol 1 Wolfe Scientific University of Cambridge p 224-225.
- SONODA, R.M., OGAWA, J. M., SHABI, E., AND MANJI, B. T. 1982. Use of interactions of cultures to distinguish *Monilinia laxa* and *Monilinia fructicola*. *Plant Dis.* 66:325-326.
- TÁLICE, R. FORMENTO, A. & HITZ, C. 1978. Control post-cosecha de podredumbres en duraznos. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Centro de Investigaciones Agrícolas, Estación Experimental Las Brujas. Hoja de divulgación N° 46.
- TOMMERUP, I.C.; BARTON, J.E. O'BRIEN, P.A. 1995. Reliability of RAPD fingerprinting of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*. *Mycol Res* 99: 179-186.
- VAN LEEUWEN, G.C.M.; VAN KESTEREN, H.A. 1998. Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Can. J. of Bot.* 76 (12): 2041-2050.