

## La mancha foliar del madroño (*Arbutus unedo*) causada por *Septoria unedonis* var. *vellanensis*

M. A. ROMERO MARTÍN, A. TRAPERO CASAS

Durante 1996-1999, se observó una mancha foliar que afectaba gravemente a los madroños (*Arbutus unedo* L.) en varios montes de Andalucía. Por ello, se desarrolló este trabajo cuyo objetivo fue caracterizar la enfermedad y su agente causal. Las observaciones de campo en cinco áreas forestales diferentes indican que la enfermedad está ampliamente distribuida en Andalucía y origina defoliaciones intensas en los madroños severamente afectados. De los tejidos necróticos de las plantas afectadas en campo, se obtuvieron 19 aislados de un hongo que ha sido identificado como *Septoria unedonis* Rob. et Desm. var. *vellanensis* Briosi et Cavara. Este hongo fue citado por primera vez como agente de mancha foliar del madroño en Italia. Los aislados del hongo crecieron en PDA a 5-30 °C, con una temperatura óptima de 21 °C. El estado sexual del hongo, identificado como *Mycosphaerella* sp., se observó en hojas afectadas que habían permanecido en el suelo durante el invierno. Las ascosporas obtenidas mediante descarga de las pseudotecas presentes en los tejidos afectados dieron lugar a colonias de *S. unedonis* var. *vellanensis*, confirmando la conexión entre los dos estados del mismo hongo. Las inoculaciones artificiales de plántulas de madroño con aislados de *S. unedonis* var. *vellanensis* demostraron la patogenicidad de este hongo sobre madroño.

M.A. ROMERO MARTÍN, A. TRAPERO CASAS. Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14071 Córdoba

**Palabras clave:** *Arbutus unedo*, *Septoria unedonis* var. *vellanensis*, *Mycosphaerella*, madroño.

### INTRODUCCIÓN

El madroño (*Arbutus unedo* L.) es uno de los arbustos más relevantes de la flora mediterránea tanto por su morfología lauroide y esclerófila como por su importancia ecológica y significación geobotánica, así como por el valor comercial de sus frutos, hojas y madera. También se reconocen sus valores paisajísticos y ornamentales (GÓMEZ, 1998).

En la Península ibérica, aunque esta especie está ampliamente distribuida, es

mucho más frecuente en las regiones periféricas debido a su preferencia por los ambientes no continentales. La versatilidad ambiental del madroño y su piroresistencia le permiten participar en numerosos tipos de agrupaciones: acompañando a especies arbóreas, tales como *Quercus* spp y *Pinus* spp., en bosques caducifolios y perennifolios esclerófilos; en las primeras etapas de degradación del bosque mediterráneo; formando parte del matorral arbustivo del maquis; y,

en ocasiones, como especie dominante constituyendo los conocidos madroñales.

En los últimos años se ha venido observando tanto en montes de las provincias de Córdoba, Málaga y Jaén como en jardines de Córdoba, una mancha foliar necrótica de color negro que presenta una elevada incidencia y severidad, llegando a ocasionar una grave defoliación de los madroños afectados. El problema fue detectado por primera vez en 1994 en los jardines de Medina Azahara (Córdoba) y, posteriormente, se comprobó su amplia distribución en numerosos lugares de Sierra Morena, como consecuencia de los estudios fitopatológicos realizados sobre otras especies forestales en Andalucía (NAVARRO, 1997; VARO, 1999). Además, en el curso de este trabajo, se ha podido constatar la presencia de la misma enfermedad en viveros forestales.

Como ocurre, en general, con las especies forestales mediterráneas, el conocimiento sobre sus enfermedades es muy limitado. No obstante, en madroño y otras especies del género *Arbutus* se han citado diversas manchas foliares (PIRONE, 1970; WESTCOTT, 1971; FARR *et al.*, 1989), entre las que cabe destacar una enfermedad de características similares a la mancha negra observada en este estudio causada por el hifomiceto *Septoria unedonis* var. *vellanensis*, que fue descrita por primera vez en 1892 en Italia (PENNISI y AGOSTEO, 1995). En España, las dos únicas referencias sobre enfermedades del madroño son una breve cita micológica sobre la presencia de *S. unedonis* var. *vellanensis* en el sureste de la Península Ibérica y una descripción reciente del puntiseado o "fagonazo" de la copa causado por *Phomopsis vaccinii* (MUÑOZ, 1999). Debido a la importancia de la enfermedad y al escaso conocimiento existente sobre la misma, la Unidad de Patología Vegetal del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba decidió iniciar un estudio para conocer su etiología; integrándose dicho estudio dentro de la línea de investigación sobre enfermedades de especies forestales

iniciada a mediados de los años 90 en dicha Unidad (TRAPERO *et al.*, 1999).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Procedencia de las muestras y aislamiento del agente

Las muestras de madroño recogidas en campo procedían de varios montes en las provincias de Córdoba, Jaén y Málaga (Tabla 1). Estas muestras, tomadas de ejemplares que presentaban gran cantidad de hojas con manchas, hojas amarillentas y defoliación excesiva, estaban formadas por ramas con hojas afectadas y, si era época, frutos y flores (Figura 1), además de hojas caídas. Asimismo, durante las prospecciones de campo se visitaron varios viveros forestales.

Las muestras se llevaron al laboratorio, donde se lavaron cuidadosamente y se seleccionaron trozos de hojas, flores, frutos y pedúnculos que serían posteriormente incubados en cámaras húmedas o sembrados en los medios de cultivo patata-dextrosa-agar (PDA) y PDA acidificado (PDAA) para el aislamiento de los hongos o bacterias asociados (DHINGRA y SINCLAIR, 1995).



Figura 1. Planta del madroño en campo. Detalle de flores, frutos inmaduros y frutos maduros en la misma rama.

Tabla 1. Origen de los aislados de *Septoria* sp. estudiados

Aislado	Zona de estudio	Fecha de aislamiento	Aislamiento (%) <sup>1</sup>
AU1 AU2 AU3 AU5 AU7	Parque periurbano "Los Villares" (Córdoba)	Febrero 1998	41.6
AU9 AU11	Cerrada de Elías. P. N. Cazorla, Segura y Las Villas (Jaén)	Abril 1998	16.6
AU12 AU13	Camino al Aula de la naturaleza "Las Cantadoras". P. N. Montes de Málaga	Mayo 1998	16.6
AU14 AU15 AU16	Carretera de Ronda a San Pedro de Alcántara (Málaga)	Noviembre 1998	12.5
AU17 AU18 AU19	Carretera Córdoba-Villaviciosa, "La Aduana" (Córdoba)	Febrero 1999	25

<sup>1</sup> Porcentaje de trozos con aislamiento positivo respecto al total de trozos de hoja, flor, fruto y pedúnculos utilizados.

### Identificación del agente

La identificación de las estructuras asexuales observadas en las hojas de madroño incubadas en cámara húmeda, así como las formadas en las colonias obtenidas en los medios PDA y PDAA a partir de los aislamientos de las lesiones, se llevó a cabo observando las características macro y microscópicas que presentaron las especies fúngicas que con más frecuencia se obtuvieron.

En las hojas caídas y que habían permanecido un tiempo en el suelo, se encontraron estructuras sexuales (ascomas, ascas y ascosporas) de una especie fúngica asociada consistentemente con las antiguas lesiones necróticas.

Para establecer la posible relación entre el estado asexual (anamorfo) y el estado sexual (teleomorfo) de la especie fúngica se procedió a la descarga de las ascosporas a partir del tejido vegetal infectado, siguiendo una metodología puesta a punto en estudios

anteriores (TRAPERO y KAISER, 1992). Esta descarga se realizó sobre agar-agua, para después transferir las ascosporas descargadas a placas de Petri con PDA.

### Crecimiento *in vitro* de los aislados

Una vez identificada la especie fúngica causante de las manchas negras en las hojas de madroño en campo, se determinó el intervalo de temperaturas en el que crecían varios aislados de dicha especie, así como la temperatura óptima de crecimiento. Para ello se seleccionaron 15 aislados, tres de cada una de las zonas estudiadas:

- "Los Villares" (Córdoba): AU2, AU3, AU7.
- Cerrada de Elías (Jaén): AU9, AU11a, AU11b.
- Montes de Málaga: AU12, AU13a, AU13b.
- "La Aduana" (Córdoba): AU14, AU15, AU16.

- San Pedro de Alcántara (Málaga): AU17, AU18, AU19.

Los aislados referidos con una letra minúscula al final son subcultivos del aislado correspondiente. Además, se incluyeron 4 aislados monoascospóricos obtenidos mediante descarga de los pseudotecios en agar-agua. Éstos aparecen referidos como AUA3, AUA4, AUA5 y AUA8

Las placas con el medio PDA se incubaron con los diferentes aislados a temperatura constante de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C. Transcurridas 4 semanas, se procedió a la medición del diámetro medio de las colonias desarrolladas.

A los datos obtenidos a partir de la medida de los diámetros de las colonias, se aplicó un análisis de varianza, para lo que se utilizó el programa estadístico "Statistix" (Analytical Software, 1996). Los valores medios de los diámetros de cada aislado se compararon entre sí para cada temperatura mediante el test de comparación de medias LSD (Diferencia Mínima Significativa) protegido de Fisher para un nivel de significación al 5% (STEEL y TORRIE, 1985).

De cada aislado se elaboraron curvas de crecimiento a las diferentes temperaturas. Para ello, los datos obtenidos se ajustaron matemáticamente a una curva de regresión, eligiendo aquélla que mejor se ajustara para el conjunto de los aislados del hongo. Esta elección se realizó en base de la significación de los parámetros estimados ( $P < 0.05$ ), a los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y a la distribución sobre los valores ajustados (Analytical Software, 1996).

### Ensayos de patogenicidad

Para evaluar la patogenicidad de los aislados y reproducir los síntomas de la enfermedad observada en el campo y en los viveros, se realizaron dos ensayos de inoculación sobre plantas de vivero y un ensayo sobre hojas separadas de la planta e incubadas en cámara húmeda.

En todos los ensayos, se empleó como inóculo suspensiones acuosas de conidias obtenidas a partir de placas de siembra masal esporuladas. La concentración a la que se intentó ajustar estas suspensiones fue de  $10^5$ - $10^6$  conidias/ml. Tanto el tipo de planta como los aislados utilizados se recogen en la Tabla 2. La aplicación del inóculo se realizó mediante pulverización de las plantas o de las hojas separadas.

Tras la inoculación, las plantas se mantuvieron durante 4 días (período de infección) en un ambiente saturado de humedad en el interior de cabinas de plástico cerradas, situadas en una cámara climática a 20-23 °C y en oscuridad. Posteriormente, la incubación de las plantas varió con el experimento.

En el ensayo I, las plantas fueron trasladadas, después del periodo de infección, a un umbráculo donde permanecieron desde finales de septiembre de 1998 hasta el desarrollo de síntomas en verano de 1999. Durante este periodo, la temperatura media del umbráculo osciló entre 5 y 30 °C, registrándose 603 mm de lluvia.

En el ensayo II, las plantas permanecieron en la cámara climática (14 horas luz/día, 20-23 °C) durante 4 meses y, posteriormente, se trasladaron al umbráculo hasta el desarrollo de los síntomas. En este caso, la inoculación se realizó en mayo de 1999 y no se observaron síntomas hasta enero-febrero de 2000. Durante el tiempo que las plantas se encontraban en el umbráculo, la temperatura media varió entre 5-20 °C y se registraron 260 mm de lluvia.

En el ensayo de patogenicidad realizado sobre hojas separadas, se emplearon los aislados AU5, AU17 y una mezcla de suspensiones conidiales de los aislados utilizados en el ensayo II de inoculación sobre planta de vivero. Las hojas inoculadas se mantuvieron en cámaras húmedas herméticamente cerradas, colocadas dentro de una cámara climática (14 horas luz/día, 20-23 °C) durante 4 meses.

Para la evaluación de los síntomas observados, se empleó una escala de severidad 0-10 (0 = 0% de superficie foliar afectada por

Tabla 2. Tipo de planta, aislado fúngico y concentración de inóculo utilizados en la inoculación de madroño con aislados de *Septoria unedonis* var. *unedonis*

Inoculación	Tipo de planta	Aislado <sup>1</sup>	Concentración (conidias/ml)	Incubación
I	2-3 savias, tronco leñoso, ramificada y con hojas viejas. 30 cm de altura.	AU1	10 <sup>6</sup>	En umbráculo (5-30 °C).
		AU5	10 <sup>6</sup>	
		AU7	10 <sup>6</sup>	
		AU9	5x10 <sup>4</sup>	
		AU11	10 <sup>6</sup>	
II	2 savias, un solo tallo algo lignificado. Con hojas nuevas y viejas. 40-50 cm de altura.	AU1	4x10 <sup>5</sup>	Durante 4 meses en cámara de cultivo (14 horas luz/día, 22°C). Después en umbráculo (5-20 °C).
		AU5	10 <sup>6</sup>	
		AU14	10 <sup>6</sup>	
		AU16	10 <sup>6</sup>	
		AU17	8x10 <sup>5</sup>	
AU19	10 <sup>6</sup>			
III	Hojas separadas, tomadas de plantas sanas en campo.	AU5	10 <sup>6</sup>	Durante 4 meses en cámara de cultivo (14 horas luz/día, 22°C).
		AU17	8x10 <sup>5</sup>	
		Mezcla <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	

<sup>1</sup> La procedencia de los aislados se indica en la Tabla 1.

<sup>2</sup> Mezcla de suspensiones igualmente concentradas de los aislados utilizados en el ensayo II.

planta, 10 = 100% de superficie foliar afectada por planta) utilizada en otros estudios (TRAPERO *et al.*, 1998). A los datos obtenidos se les aplicó el análisis de la varianza y los valores medios se compararon entre sí mediante el test LSD protegido de Fisher para P=0.05 (STEEL y TORRIE, 1985).

## RESULTADOS

### Sintomatología

Las plantas de madroño observadas en las diferentes zonas de estudio (Tabla 1) así como en los viveros, presentaban, en general, defoliación, un alto número de hojas cloróticas con manchas, hojas verdes con lesiones en toda la superficie (Fig. 2A) y, en el caso que fuera época, escasa floración y fructificación. No obstante, la distribución de las plantas afectadas era muy heterogénea. En una misma zona se podía encontrar

plantas de madroño severamente afectadas y próximas a ellas otras plantas que sólo tenían algunas hojas afectadas.

Las lesiones que presentaban las hojas verdes tenían tamaños que oscilaban entre 1-4 mm de diámetro, éstas comenzaban siendo pequeños puntitos rojos que, al ir evolucionando la enfermedad, aumentaban en tamaño y se volvían de color negro con el centro grisáceo y rodeadas por un halo rojizo (Fig. 2B). Estas manchas de contornos irregulares se encontraban repartidas por toda la superficie foliar y afectaban tanto al haz como al envés (Fig. 2C). Al observar las manchas por el microscopio estereoscópico se veían pequeños cuerpos negros en la citada zona grisácea. Con los montajes realizados de estos cuerpos, se pudo comprobar que se trataban de conidiomas picnidiales (picnidios) inmersos en el tejido foliar.

Las flores y frutos sólo se recogieron en la zona de "La Aduana" durante el mes de noviembre. Los ramilletes florales contenían

un número muy bajo de flores y la mayoría de ellas presentaban la base de las corolas con lesiones de color pardo que se extendían hasta el pedúnculo (Fig. 2C). Junto a las flores se encontraban los frutos con pequeñas manchas oscuras de 1-2 mm repartidas por su superficie (Fig. 2D). Tanto los frutos como las flores se observaron al microscopio estereoscópico sin detectarse ninguna estructura fúngica asociada a las manchas.

### Aislamiento e identificación genérica del agente

Los aislamientos en PDA y PDAA partir de hojas con lesiones comenzaron a realizar-

se a principios de noviembre de 1997, no obteniéndose inicialmente ninguna colonia bacteriana o fúngica consistentemente asociada a los tejidos afectados. Los aislamientos se sucedieron varias veces con resultados negativos, hasta que se obtuvieron las primeras colonias fúngicas puras a finales de febrero de 1998. Posteriormente, de todos los aislamientos de hojas verdes con manchas procedentes de las diferentes zonas de estudio, se seleccionaron un total de 19 aislados puros que se identificaron con las letras AU y un número de orden. El origen de estos aislados se recoge en la Tabla 1. En general, las colonias tenían formas redondeadas, con bordes lisos o algo irregulares, de color negro entremezclándose con hifas de



Figura 2A. Plantas de madroño severamente afectadas. Nótase la elevada incidencia de hojas cloróticas y el comienzo de la foliación.



Figura 2B. Detalle de hoja con lesiones desarrolladas. Puede apreciarse el centro ceniciento en algunas manchas de color negro.



Figura 2C. Lesiones necróticas en hojas, peciolos y pedúnculos.



Figura 2D. Lesiones necróticas en frutos y pedúnculos.



Figura 3A. Picnidios parcialmente emergidos en el centro de una lesión foliar.



Figura 3B. Trozo de picnidio y masa de conidias.



Figura 3C. Conidias de un aislado procedente de la zona de "Los Villares" (Córdoba).



Figura 3D. Conidias del aislado AU14. Se pueden apreciar varias septas transversales en la conidia.

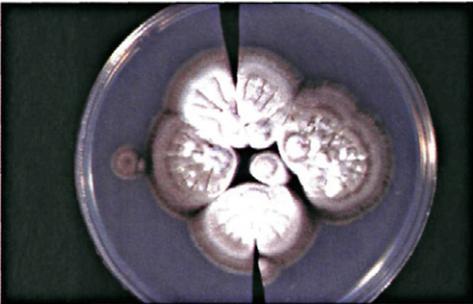


Figura 3E. Colonias del aislado AU13 creciendo en PDA. Se puede observar la alta presencia de micelio blanco y rotura del medio de crecimiento.



Figura 3F. Colonia típica en el medio PDA.

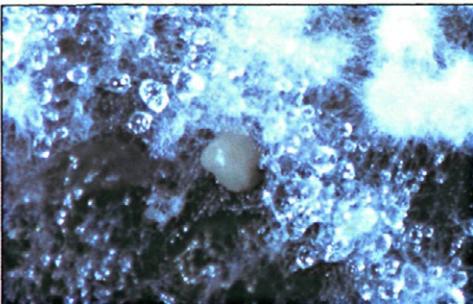


Figura 3G. Detalle de exudado de color crema constituido por una masa de conidias.

Figura 3. Características de los aislados de *Septoria unedonis* obtenidos de madroños afectados de la mancha negra.

color blanco y con un mayor crecimiento en la dirección vertical que en la horizontal, rompiendo diametralmente el medio en el que crecían (Fig. 3E).

Los porcentajes de aislamiento fueron bajos, aunque desiguales según la zona de estudio (Tabla 1), obteniéndose los mayores valores en las muestras procedentes de la sierra de Córdoba. En ningún caso se aislaron bacterias de los tejidos afectados.

En los aislamientos realizados a partir de los frutos y pedúnculos de las plantas sintomáticas procedentes de la zona de "La Aduana", no se obtuvo ningún organismo consistentemente asociado en los medios de cultivo PDA y PDAA. Por esta razón y por la estacionalidad de la fructificación y floración no se tomaron muestras en el resto de las zonas.

En las hojas incubadas en cámara húmeda, se observaron picnidios de color negro tanto en la zona cenicienta del centro de la lesión como en los bordes (Fig. 3A). Normalmente, se encontraban solitarios y par-

cialmente inmersos en el tejido vegetal. Producían un abundante exudado de color crema formado por una masa de conidias hialinas, filiformes, de curvatura variable y multiseptadas. Aunque, de los montajes de estos picnidios de hojas incubadas en cámara húmeda se obtenía normalmente la misma especie fúngica del género *Septoria*, cuando se llevaban a cabo los aislamientos de la correspondiente muestra, el medio de crecimiento PDA era invadido por hongos de crecimiento más rápido, como especies de los géneros: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Coniothyrium* y *Phoma*.

### Identificación específica del anamorfo

Tanto en el tejido vegetal como en el cultivo puro en el medio PDA se pudieron observar los picnidios del hongo consistentemente asociado con los tejidos afectados. En el tejido vegetal, se caracterizaban por ser esféricos, de color negro, solitarios o agrupa-

Tabla 3. Dimensiones de las conidias y número de septas de 15 aislados de *Septoria unedonis* var. *vellanensis* cultivados en PDA

Aislado	Conidias		Número de septas
	Longitud	Anchura	
AU1	40.8 ± 7.0b*	2.5 ± 0.4abc	2-3
AU2	48.0 ± 14.4ab	2.7 ± 0.8ab	2-3
AU5	44.7 ± 6.2b	2.8 ± 0.3a	2-3
AU7	45.8 ± 9.6ab	2.8 ± 0.4a	2-3
AU9	54.2 ± 10.2ab	2.1 ± 0.4bcd	3-4
AU11	45.5 ± 5.3b	1.9 ± 0.4cd	3-4
AU12	44.0 ± 10.3b	1.7 ± 0.3d	3-4
AU13	41.0 ± 8.1b	1.6 ± 0.3d	3-4
AU14	51.5 ± 8.4ab	1.6 ± 0.3d	3-5
AU15	49.7 ± 7.0ab	1.9 ± 0.3cd	3-4
AU16	45.3 ± 5.9b	2.0 ± 0.4cd	3-4
AU17	59.3 ± 10.1a	1.9 ± 0.3cd	3-5
AU18	52.1 ± 11.5ab	2.2 ± 0.4a-d	3-5
AU19	50.2 ± 9.1ab	1.9 ± 0.4cd	3-5

\* Los valores vienen expresados en  $\mu\text{m}$ . Cada valor es la media de 20 observaciones  $\pm$  la desviación estándar. Las medias seguidas de una letra común no difieren significativamente entre sí según el test de Scheffé protegido de Fisher para  $P=0.05$  (Steel y Torrie, 1985).



Figura 4 A. Hoja con lesiones de mancha negra que ha permanecido durante el invierno en el suelo en las que pueden apreciarse los ascomas (pseudotecios) distribuidos irregularmente alrededor de las antiguas lesiones.

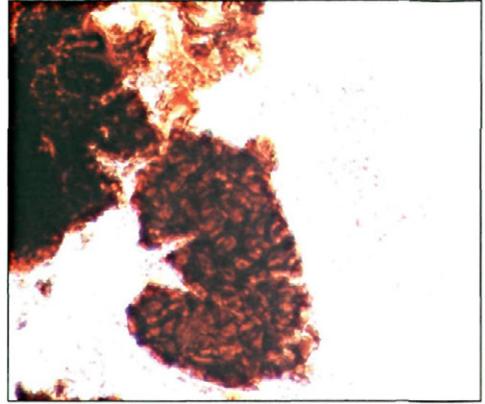


Figura 4 B. Trozos de ascomas y ascas agrupadas en fascículos.



Figura 4 C. Ascas con ascosporas. Se pueden apreciar las ocho ascosporas y la doble pared del asca.

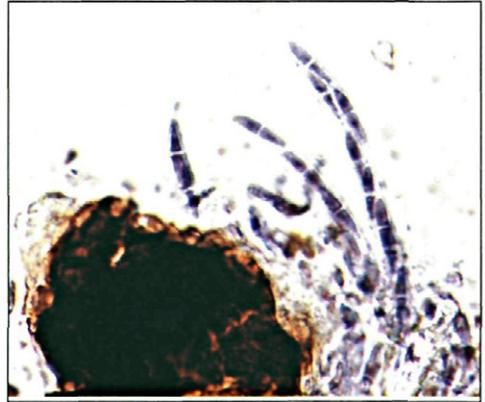


Figura 4 D. Detalle de las ascosporas fusiformes con la septa central.



Figura 4 E. Detalle de las ascosporas fusiformes con la septa central.

Figura 4. Identificación de *Mycosphaerella* sp.

dos, parcialmente inmersos y localizados principalmente en la zona blanca-grisácea de la lesión. En el medio PDA, no se pudo determinar con exactitud la morfología de los picnidios, ya que estaban inmersos en el estroma fúngico. Al madurar el picnidio, producía un exudado de color crema constituido por una masa de conidias (Fig. 3G).

Las conidias eran hialinas, filiformes, con una curvatura variable, de ápices redondeados y generalmente de 3-4 septas, aunque también se observaron conidias con 1-6 septas, en ningún caso se observó contracción en la zona de la septa (Fig. 3B, 3C y 3D). La longitud varió entre los 30-70  $\mu\text{m}$  y su anchura entre 1.2-3.7  $\mu\text{m}$ , siendo los valores medios de  $48.0 \pm 10.2 \mu\text{m}$  para la longitud y de  $2.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$  la anchura (Tabla 3).

Las características de estas estructuras asexuales corresponden a las descritas por diversos autores (SUTTON, 1980; ARX 1987; AGRIOS 1997) para el género *Septoria* Fr. Con respecto a la especie, se trata de *Septoria unedonis* Rob. in Desm., y podría clasificarse como la variedad *vellanensis* Briosi et Cavara, ya que hay correspondencia completa con el hongo *Septoria unedonis* var. *vellanensis* estudiado por Pennisi y Agosteo (1995) en Calabria y Sicilia (Italia).

### Identificación específica del teleomorfo

Las estructuras sexuales sólo se observaron en las hojas caídas que llevaban un cierto tiempo en el suelo durante el invierno (Fig. 4A). Los ascomas o pseudotecios se localizaron solitarios en las zonas que rodeaban a las antiguas lesiones. La morfología de estos cuerpos tampoco se pudo determinar. No obstante, se observaron estructuras esféricas, formadas por gruesas capas de células (Fig. 4B).

Las ascas se caracterizaron por ser bitunicadas, hialinas, alargadas y formando fascículos. El tamaño medio fue de 32-43  $\mu\text{m}$  de longitud y 6.2  $\mu\text{m}$  de anchura (Fig. 4C). En su interior se encontraban 8 ascosporas, las cuales eran fusiformes, hialinas, bicelula-

res con la septa en el centro o muy próximo a él (Fig. 4D, 4E). Las dimensiones de las ascosporas fueron de 9-11.5  $\mu\text{m}$  de longitud y de 1.6  $\mu\text{m}$  de anchura en la zona media.

Las características de las estructuras sexuales han permitido identificar al ascomi-ceto como una especie del género *Mycosphaerella* Johanson (SIVANESAN, 1984; CORLETT y MCGREGOR, 1991; HANLIN, 1998). El tamaño de las ascas y de las ascosporas se encuentra dentro de las dimensiones dadas por CORLETT y MCGREGOR (1991) para *Mycosphaerella unedonis* Jaap., aunque las ascas y ascosporas de los aislados estudiados aquí son de menor tamaño y, por tanto, no se puede afirmar que se trate de esa especie pues no se pudo disponer de una descripción más detallada de la misma.

La correspondencia entre anamorfo y teleomorfo pudo establecerse debido a que las colonias obtenidas en placas con el medio de cultivo PDA, una vez realizada la siembra individual de las ascosporas, se correspondieron en todos los casos con la especie *S. unedonis* var. *vellanensis* (SUTTON, 1980; ARX, 1987).

### Crecimiento *in vitro* de los aislados

Las colonias en PDA presentaban una morfología irregular y un crecimiento lento, por lo que se eligió el valor del diámetro medio a las 4 semanas para determinar la tasa de crecimiento.

El intervalo de temperaturas para el crecimiento de las colonias fue de 5 a 30 °C, con un desarrollo mayor en la dirección vertical que en la horizontal, formando masas de cuerpos muy compactas, de color negro entremezcladas con algo de micelio blanco (Fig. 3F). A 15, 20, 25 y 30 °C, las colonias adquirieron forma de cúpula, pues inicialmente agrietaban y rompían el medio nutritivo PDA por debajo y alrededor de la colonia, absorbiéndolo y formando una pequeña cámara de aire debajo, produciéndose picnidios en esa zona. También se observó que algunas colonias de los aislados AU3 y

AU11a a 20 °C llegaban a agrietarse cuando adquirían la forma de cúpula. La rotura del PDA alrededor de la colonia daba lugar a un crecimiento irregular, pues ésta sólo podía desarrollarse por aquellas zonas en las que permanecían unidas al medio de cultivo (Fig. 3E).

Para la temperatura superior, 35 °C, se obtuvieron pocos datos, pues el medio se contaminaba fácilmente de bacterias y hongos. Aún así, se pudo comprobar que las

colonias crecían, aunque muy escasamente (entre 0.1-1 mm).

Después de evaluar varios modelos para el ajuste de los datos, se eligió el que mejor cumplía las condiciones de distribución de residuos, coeficiente de determinación y significación de los coeficientes de regresión. Para cada aislado se determinó la curva de crecimiento a las distintas temperaturas mediante el polinomio de tercer grado:

$$Y=aT^2+bT^3$$

Tabla 4. Ajuste polinómico del efecto de la temperatura sobre el crecimiento en PDA de aislados de *Septoria unedonis* var. *vellanensis*

Aislado	Coeficientes de regresión <sup>1</sup>		R <sup>2</sup>	Temperatura óptima (°C)	Diámetro máximo (mm/mes)
	a	b			
AU2	0.1700	-0.0048	0.946	21.2	25.8
AU3	0.1435	-0.0041	0.883	21.0	21.3
AU7	0.1743	-0.0051	0.931	21.2	26.0
AU9	0.1441	-0.0041	0.895	20.9	21.5
AU11 <sub>a</sub>	0.1585	-0.0046	0.916	21.3	22.5
AU11 <sub>b</sub>	0.1674	-0.0048	0.908	20.5	25.4
AU12	0.1519	-0.0043	0.917	21.2	23.3
AU13 <sub>a</sub>	0.2357	-0.0071	0.875	20.2	35.9
AU13 <sub>b</sub>	0.2200	-0.0066	0.886	20.3	33.1
AU14	0.1228	-0.0035	0.951	22.1	16.7
AU15	0.1449	-0.0041	0.951	22.5	21.6
AU16	0.1581	-0.0045	0.942	21.5	23.5
AU17	0.1601	-0.0046	0.949	21.8	23.1
AU18	0.1354	-0.0038	0.892	21.1	20.2
AU19	0.1242	-0.0035	0.926	21.9	17.9
<b>Global AU<sup>2</sup></b>	0.1335	-0.0039	0.932	21.9	22.4
AUA3	0.1049	-0.0031	0.946	23.5	18.4
AUA4	0.0981	-0.0029	0.991	22.8	17.5
AUA5	0.0962	-0.0027	0.982	26.3	16.4
AUA8	0.0778	-0.0022	0.975	24.8	14.8
<b>Global AUA<sup>2</sup></b>	0.0938	-0.0028	0.904	22.3	16.0
<b>LSD<sub>0.05</sub></b>				2.64	5.36

<sup>1</sup> a y b se corresponden a los coeficientes del polinomio de tercer grado:  $Y=aT^2+bT^3$ . En el que Y representa el diámetro medio a las 4 semanas y T es la temperatura de crecimiento.

<sup>2</sup> Ajustes globales para los 15 aislados masales (AU) y para los 4 aislados monoascospóricos (AUA).

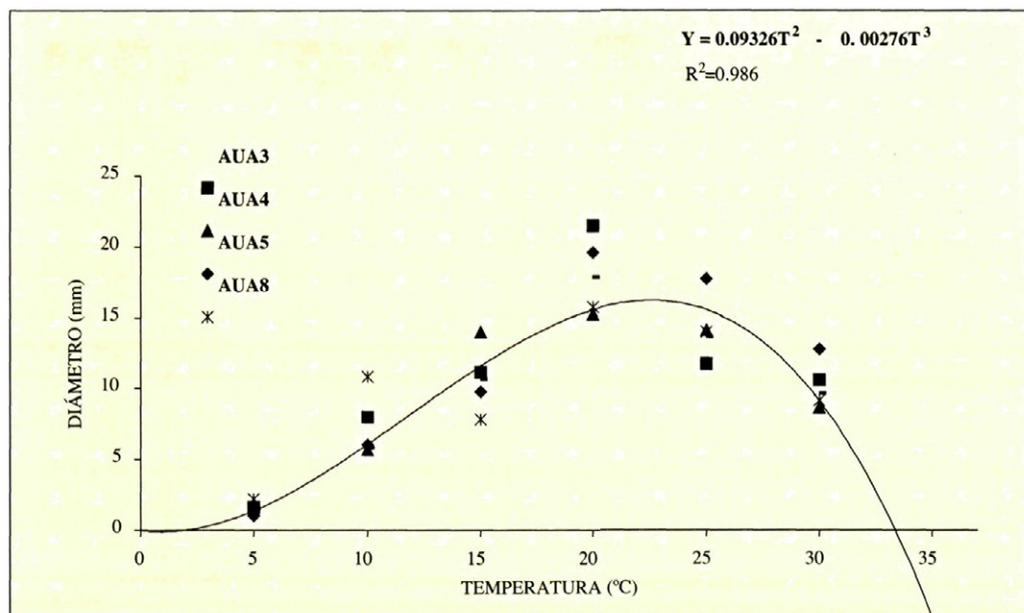
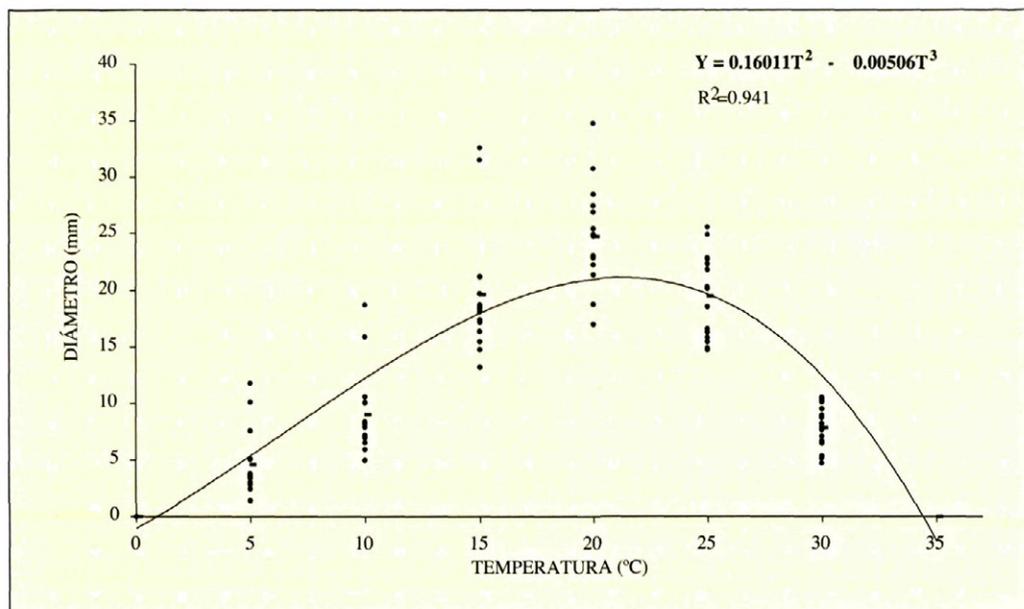




Figura 6A. Planta de madroño inoculada con *S. unedonis*.



Figura 6 B. Detalle de las manchas necróticas de color negro en plantas inoculadas.



Figura 6 C. Detalle de las manchas necróticas de color negro en plantas inoculadas.



Figura 6 D. Hojas cloróticas de plantas inoculadas. Se puede observar que las manchas se encuentran distribuidas por todo el limbo foliar.

Figura 6. Síntomas en plantas de madroño inoculadas con *Septoria unedonis*.

donde  $Y$  representa el diámetro medio a las 4 semanas,  $T$  es la temperatura de crecimiento ( $^{\circ}\text{C}$ ) y  $a$  y  $b$  son los coeficientes de regresión.

En la Tabla 4 se recogen los valores de los parámetros más significativos del ajuste realizado para los 15 aislados masales y los 4 aislados monoascospóricos. Estos últimos presentaron una menor tasa de crecimiento y una temperatura óptima mayor que la mayoría de los aislados masales. Por ello, los ajustes globales se han realizado separando ambos grupos de aislados. En la Fig. 5A se representa la curva global del ajuste para los

15 aislados masales, incluyendo el diámetro medios de las colonias, mientras que la Fig. 5B se representa el mismo ajuste para los aislados monoascospóricos.

### Patogenicidad de los aislados

En la primera inoculación sobre plantas de vivero, no se observaron síntomas hasta diciembre de 1998 (Fig. 6A). Estos consistían en pequeños puntitos rojos distribuidos por toda la superficie foliar. Cuando la infección avanzó, las manchas no superaban los

Tabla 5. Severidad media de las infecciones en plántulas de madroño inoculadas con aislados de *Septoria unedonis* var. *vellanensis* <sup>a</sup>

Aislado	Inoculación	
	I	II
AU1	3.5	0.5 c*
AU5	4.2	2.0 b
AU7	4.5	–
AU9	4.7	–
AU11	4.5	–
AU12	–	–
AU14	–	1.7 bc
AU16	–	0.7 bc
AU17	–	3.5 a
AU19	–	1.6 bc

<sup>a</sup> Los valores son la media de 4 repeticiones de cada aislado en la inoculación I y de 5 repeticiones en la inoculación II.

\* Las medias seguidas de una letra común no difirieron significativamente entre sí según el test LSD protegido de Fisher para P=0.05 (Steel y Torrie, 1985).

- Combinaciones experimentales no ensayadas.

4 mm de diámetro y eran muy numerosas (Fig. 6B, 6C). Antes de que su centro se tornara blanco-grisáceo, las manchas eran totalmente negras rodeadas de un halo rojizo. En enero-febrero de 1999, prácticamente todas las hojas estaban atacadas en mayor o menor medida. Las hojas más atacadas y más viejas se volvieron amarillas y cayeron (Fig. 6D). La defoliación coincidió con la formación de nuevos brotes de primavera, dando lugar a plantas con brotes que presentaban hojas de mayor tamaño por debajo de las cuales había una falta total de hojas.

En cuanto a la segunda inoculación, durante el tiempo en el que las plantas permanecieron en la cámara climática, no mostraron síntomas. Estos aparecieron cuando las plantas llevaban cuatro meses en el umbráculo. Las lesiones que se observaron en las hojas eran las típicas de *S. unedonis* var. *vellanensis*, descritas anteriormente.

En la Tabla 5 se recoge la severidad de los síntomas observados en las plantas inocula-

das. Una vez evaluada la severidad en las plantas inoculadas, se procedió a realizar el aislamiento de las manchas observadas en las hojas. En los dos ensayos se volvió a aislar consistentemente *S. unedonis* var. *vellanensis*.

Las hojas sueltas inoculadas no desarrollaron ningún tipo de mancha. Al final del ensayo, había hojas que se encontraban en perfecto estado y habían producido un callo en el pedúnculo.

## DISCUSIÓN

La mancha negra es una necrosis foliar ampliamente distribuida en los madroños de Andalucía, lo que se corresponde con la amplia distribución de la enfermedad en la cuenca del Mediterráneo (UNAMUNO, 1941; DÍAZ *et al.*, 1987; PENNISI y AGOSTEO, 1995) y en Norteamérica (FARR *et al.*, 1989). En todos los lugares prospectados, así como en varios viveros forestales, se pudieron observar plantas severamente afectadas por la enfermedad. Los ejemplares afectados no presentan una distribución homogénea en campo, esto puede ser atribuido a la diferencia de susceptibilidad entre plantas que presentaban las madroñeras. La elevada incidencia y severidad de la enfermedad podría estar relacionada con las intensas lluvias de otoño-invierno durante el periodo 1995-98, ya que la lluvia es el principal medio de diseminación del inóculo de los hongos causantes de necrosis foliares (AGRIOS, 1997). Esta circunstancia ha quedado puesta de manifiesto por la elevada incidencia que presentaron este tipo de enfermedades durante dicho período en Andalucía, tanto en especies forestales (GUTIÉRREZ, 1999; TRAPERO *et al.*, 1999, VARO, 1999), como en cultivos agrícolas (TRAPERO *et al.*, 1998).

Las manchas negras sólo se observaban en las hojas de los madroños, mientras que otras especies acompañantes, como encinas, alcornoques, jaras y otros matorrales, no mostraban este tipo de síntoma. Esto es debido a la posible especificidad de huésped que muestran las especies del género *Septoria*,

aunque esta especificidad todavía no ha sido bien estudiada (SUTTON, 1980).

En cuanto a las lesiones observadas en pedúnculos, flores y frutos, no se aisló *S. unedonis* ni ningún otro organismo en los aislamientos realizados de estas partes de la planta. Tampoco se han descrito lesiones de este tipo en madroño (PENNISI y AGOSTEO, 1995). Aún así, no se descarta que las manchas en flores y frutos sean causadas por *S. unedonis*, ya que para algunas especies de *Septoria* se han descrito manchas de color pardo oscuro en dichos tejidos (AGRIOS, 1997). La dificultad para el aislamiento de *Septoria* de los tejidos afectados, debido al lento crecimiento del patógeno en PDA, así como la abundante presencia en los tejidos florales de saprotrofos de crecimiento rápido como especies de *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, etc, podrían haber contribuido a esta falta de aislamiento del patógeno en dichos tejidos. En cualquier caso, el porcentaje de aislamiento de *Septoria* a partir de las lesiones foliares nunca superó el 42%, obteniéndose los mayores valores cuando los aislamientos se realizaban en invierno, lo que coincidió también con un menor aislamiento de hongos saprotrofos de crecimiento rápido.

Las características distintivas de la mancha negra descritas sobre las hojas de madroño, así como las estructuras fúngicas asociadas a las lesiones necróticas, identificadas como picnidios, y las observaciones macro y microscópicas de las colonias obtenidas a partir de los aislamientos de las lesiones, nos ha permitido identificar al agente causal como *Septoria unedonis* Rob. in Desm. (PENNISI y AGOSTEO, 1995), especie mitospórica descrita por primera vez en 1847 (MOORE, 1959) y que parece específica del madroño (PIRONE, 1970; WESTCOTT, 1971). En los diferentes aislados obtenidos, se observaron diferencias significativas en cuanto a longitud y anchura de las conidias aunque los aislados de una misma zona presentaban dimensiones similares. La presencia de multiseptas transversales en las conidias, de número variable según aislados, y

las dimensiones medias de las mismas, se corresponden con la variedad *vellanensis* descrita por primera vez en 1892 en Vellano (Italia) por Briosi y Cavara (PENNISI y AGOSTEO, 1995) y, posteriormente, en el suroeste español (DÍAZ *et al.*, 1987) y en los madroños de Calabria y Sicilia (PENNISI y AGOSTEO, 1995).

En las hojas procedentes de las muestras de campo, también se observaron unas manchas necróticas anulares sin que se encontraran estructuras asociadas, al realizarse observaciones de las mismas al microscopio estereoscópico, ni se aislara ningún organismo. Estas manchas anulares se detectaron en varias zonas de las sierras de Córdoba y Jaén. La única referencia que se tiene de unas manchas similares a éstas en madroño procede del Sur de Italia (RAGOZZINO *et al.*, 1995) y se trata de lesiones causadas por un posible virus de transmisión por injerto, todavía no identificado.

Así mismo, en plántulas de madroño que se encuentran en un vivero de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes de Córdoba, se detectaron lesiones foliares ligeramente distintas a las observadas en campo. Aunque, inicialmente estas manchas eran pequeñas y rojizas, al avanzar la enfermedad, el tejido afectado se necrosaba y adquiría un color marrón oscuro por el centro, diferenciándose en esto de la mancha causada por *S. unedonis*. En este caso, el patógeno fue identificado como *Pestalotiopsis* sp. (ROMERO, 2000)

Las hojas de madroño que permanecían en el suelo sin descomponerse durante el invierno, mostraban en las antiguas lesiones estructuras fúngicas correspondientes a un ascomiceto. Por la morfología de las ascas y de las ascosporas que se observaron en los ascomas (pseudotecios), este hongo se identificó como una especie de *Mycosphaerella* sp., uno de los géneros identificado como teleomorfo del género *Septoria* (SUTTON, 1980; HANLIN, 1998). La relación anamorfo-teleomorfo se pudo establecer al llevarse a cabo la descarga de las ascosporas a partir de los pseudotecios formados en las hojas caí-

das al suelo. Una vez sembradas las ascosporas en el medio PDA, se obtuvieron colonias monoascospóricas que se identificaron como *Septoria unedonis* var. *vellanensis* (PENNISI y AGOSTEO, 1995).

La identificación específica del hongo no pudo completarse, ya que las características del holomorfo (teleomorfo + anamorfo) observadas en nuestro estudio no se corresponden con las de ninguna especie conocida. En madroño, se han descrito dos especies del género *Mycosphaerella*. Una de ellas, identificada como *M. unedonis* (CORLETT y MCGREGOR, 1991), presenta ascas y ascosporas de mayor tamaño. La otra especie se identificó como *Sphaerella* (= *Mycosphaerella*) *maculiformis*, a pesar de haberse encontrado asociada con *Septoria unedonis* en hojas de madroño (UNAMUNO, 1941). Esta segunda especie presenta también ascosporas de mayor tamaño y su anamorfo no se corresponde con especies de *Septoria*.

También se encontraron similitudes con especies de *Mycosphaerella* descritas en otros huéspedes (SIVANESAN, 1984), concretamente con *M. pyri* y *M. coptis*. Las diferencias que mostraban estas dos especies respecto a la observada en madroño era que la primera presentaba ascosporas de menor tamaño, mientras que la otra, al considerar el autor el tamaño de las conidias del estado anamórfico de la especie, resultaban ser también conidias de menor tamaño. Por ello, y ante la falta de una revisión taxonómica del género *Septoria* y sus teleomorfos (SUTTON, 1980; SIVANESAN, 1984; ARX, 1987), no se ha podido llegar a una identificación específica del teleomorfo determinado en nuestro estudio.

El crecimiento de los aislados de *S. unedonis* en el medio PDA mostró diferencias significativas entre ellos. Las diferencias más relevantes correspondían al aislado de mayor crecimiento (AU13), frente a los de menor crecimiento (AU14 y AU19). Los 4 aislados monoascospóricos presentaron un menor crecimiento relativo, similar al AU14, el cual fue obtenido de la misma planta de donde procedían los monoascospóricos. El

resto de los aislados mostraron diferencias de crecimiento menos marcadas entre ellos, lo que indica la gran variabilidad que presenta la especie indistintamente del lugar de procedencia de los aislados. Además, todos los aislados presentaron un patrón de crecimiento similar, por lo que se pudo ajustar el mismo modelo matemático y representar la variación de diámetro de las colonias con la temperatura. El amplio intervalo de la temperatura de crecimiento (5-30 °C), junto a la temperatura óptima (20-22.2 °C), indican una buena adaptación de la especie *S. unedonis* a las condiciones ambientales en las que crece el madroño; sobre todo, durante los periodos de lluvia en que tienen lugar las infecciones.

Los ensayos de patogenicidad de *S. unedonis* se realizaron sobre plantas con buen estado de vigor y en condiciones ambientales favorables para su crecimiento. En los dos ensayos de patogenicidad realizados, se reprodujeron los síntomas característicos de la enfermedad. El posterior reaislamiento de *S. unedonis* de los tejidos afectados de las plantas inoculadas, permitió confirmar la eficacia del hongo como patógeno de madroño, como ya indicaban las observaciones de campo. Cabe destacar el largo periodo que transcurría desde la realización de las inoculaciones hasta que se manifestaban los primeros síntomas.

La fecha en la que se obtuvieron las primeras colonias de *S. unedonis*, como la época en la que se observó la mayor severidad de la enfermedad en campo y la aparición de los síntomas en las plantas inoculadas, además de la temperatura óptima de crecimiento del hongo, nos hace pensar que esta especie fúngica pueda tener periodos de latencia prolongados en espera de condiciones más favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Este trabajo constituye la primera descripción de *S. unedonis* como patógeno de *A. unedo* en España, además supone la primera conexión con su teleomorfo, una especie del género *Mycosphaerella*, que no ha podido ser identificada específicamente.

## AGRADECIMIENTOS

Tecnología (CICYT), en el marco de los proyectos FO96-006 y 1FD97-0911-CO3-03.

Esta investigación ha sido financiada por la Comisión Interministerial de Ciencia y

## ABSTRACT

ROMERO-MARTÍN, M.A., A. TRAPERO CASAS. 2003. Leaf spot of strawberry tree (*Arbutus unedo*) caused by *Septoria unedonis* var. *Vellanensis*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 375-392.

A necrotic leaf spot disease has been severely affecting strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in Andalucía, southern Spain, during 1996-1999. Therefore, the aim of the present work was to characterize this disease and its causal agent. Field surveys carried out in five forest areas showed that necrotic leaf spot was widely distributed causing heavy defoliation in severely affected strawberry trees. A total of 19 isolates of a fungus were consistently obtained from the necrotic tissues. Morphological characterization of these isolates led us to identify the fungus as *Septoria unedonis* Rob. et Desm. var. *vellanensis* Briosi et Cavara, a mitosporic fungus first reported causing leaf spot on strawberry tree in Italy. Fungal isolates grew well at 5-30°C, with the optimum temperature at 21 °C. The sexual stage of the fungus, identified as *Mycosphaerella* sp., was found on the fallen leaves under field conditions during the winter. Ascospores discharged from the affected tissues produced colonies of *S. unedonis* var. *vellanensis*, confirming the relationship between both fungal stages. Artificial inoculations of strawberry tree seedlings with several isolates of *S. unedonis* var. *vellanensis* demonstrated the pathogenicity of this fungus on strawberry tree.

**Key words:** *Arbutus unedo*, *Septoria unedonis* var. *vellanensis*, *Mycosphaerella*, strawberry tree.

## REFERENCIAS

- AGRIOS G. N. 1997. Plant pathology. Academic Press, San Diego, USA. 635 pp.
- ANALYTICAL SOFTWARE. 1996. Statistix 4.1. Tallahassee, FL. 329 pp.
- ARX J.A. VON. 1987. Plant pathogenic fungi. J. Cramer, Berlin. 288 pp.
- CORLETT M., MCGREGOR R.M. 1991. An annotated list of the published names in *Mycosphaerella* and *Sphaerella*. J. Cramer, Berlin. 328 pp.
- DHINGRA O.D., SINCLAIR J.B. 1995. Basic Plant Pathology methods. CRC Press, Boca Raton, FL. 434 pp.
- DIAZ G., HONRUBIA M., TORRES P. 1987. Notas sobre folicolas del Sureste español. *Rev. Iber. Micol.* 4: 93-104.
- FARR D. F., BILLS G. F., CHAMURIS G. P., ROSSMAN A. Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press, St. Paul, MN. 1252 pp.
- GÓMEZ MANZANEQUE F. (coord.). 1998. Los bosques ibéricos. Edit. Planeta, Barcelona. 597 pp.
- GUTIÉRREZ GARCÍA J. 1999. El chancro y marchitez de ramas de *Cistus ladanifer* causado por *Botryosphaeria ribis*. Proyecto fin de carrera, ETSIAM, Universidad de Córdoba. 143 pp.
- HANLIN R.T. 1998. Illustrated genera of Ascomycetes. APS Press, St. Paul, MN. 263 pp.
- MOORE W.C. 1959. British parasitic fungi. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 430 pp.
- MUÑOZ C. 1999. *Phomopsis vaccinii* Shear in Shear, Stevens & Bain asociado con daños en las copas de los madroños (*Arbutus unedo* L.). XVI Reunión del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques y Jardines. Junta de Andalucía. Córdoba. pp. 291-295.
- NAVARRO GONZÁLEZ N. 1997. Gama de huéspedes y supervivencia de *Spilocaea oleagina* Proyecto Fin de Carrera, ETSIAM, Universidad de Córdoba. 122 pp.
- PENNISI A.M., AGOSTEO G.E. 1995. *Septoria unedonis* var. *vellanensis* agente di manchie fogliari su corbezzolo. *Informatore Fitopatologico* 2: 58-60.
- PIRONE P.P. 1970. Diseases and pest of ornamental plants. Ed. 4 th. The Ronald Press Company, N.Y. pp. 138-139.

- RAGOZZINO A., ALIOTO D., STAVOLONE L. 1995. A Virus-like of strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) Acta Horticulturae 385:110-112.
- ROMERO MARTIN M.A. 2000 Etiología de la manchas foliar del madroño (*Arbutus unedo* L.) causada por *Septoria unedonis* Rob in Desm. Proyecto Fin de Carrera, ETSIAM, Universidad de Córdoba. 116 pp.
- SIVANESAN A. 1984. The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs. J. Cramer, Vaduz, Germany. 701 pp.
- STEEL G.D., TORRIE J.H. 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos. Mc Graw-Hill, Bogotá. 622 pp.
- SUTTON B.C. 1980. The *Coelomycetes*. Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 696 pp.
- TRAPERO A., KAISER W.J. 1992. Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. Phytopathology 82: 1261-1266.
- TRAPERO CASAS A., LÓPEZ DONCEL L.M., VIRUEGA PUENTE J.R. 1998. Los "Repilos" del olivo: etiología, epidemiología y estrategias de control. Phytoma 102:154-158.
- TRAPERO A., SÁNCHEZ M.E., NAVARRO N., VARO R., GUTIÉRREZ J., ROMERO M.A., ANDICOBERRY S. 1999. Algunas enfermedades de especies forestales en Andalucía durante 1996-1999. XVI Reunión del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques y Jardines, Junta de Andalucía, Córdoba. pp. 175-179.
- UNAMUNO L.M. 1941. Enumeración y distribución geográfica de los ascomicetos de la Península Ibérica y de las Islas Baleares. Vol. I. Real Academia de las Ciencias, Madrid. 403 pp.
- VARO SÁNCHEZ M.R. 1999. Micosis del algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.) y del pino piñonero (*Pinus pinea* L.) en viveros forestales de Andalucía. Proyecto Fin de Carrera, ETSIAM, Universidad de Córdoba. 166 pp.
- WESTCOTT C. 1971. Plant disease handbook. Van Nostrand Reinhold, N.Y. 843 pp.

(Recepción: 17 septiembre 2002)

(Aceptación: 9 octubre 2002)