

Fusicladium eriobotryae: hongo causante del moteado del níspero en el Mediterráneo español

P. SÁNCHEZ TORRES, R. HINAREJOS, J. J. TUSET

Se ha aislado el patógeno fúngico responsable del moteado en níspero del Mediterráneo español y ha sido identificado como *Fusicladium eriobotryae* de acuerdo a sus caracteres morfológicos y genéticos. Los síntomas del moteado del níspero en la región Mediterránea se muestran de forma severa en ambos lados de las hojas y en el fruto, apareciendo en forma de manchas verdes o parduzcas. La lesión es normalmente circular y su tamaño aumenta a medida que avanza la enfermedad volviéndose olivácea y aterciopelada debido a la presencia de esporas. Los síntomas del moteado se han reproducido utilizando un sistema de infección *in vivo*. Así mismo, se ha llevado a cabo la infección de plantas de nísperos con los aislados *F. eriobotryae* (NSH y NCH) y con especies muy relacionadas tales como *Venturia inaequalis*, *Venturia pirina*, *Spilocaea pomi*, *Spilocaea eriobotryae*, *Fusicladium carpophilum* estudiando los síntomas producidos. Además se ha realizado la caracterización molecular comparando el rDNA de todos los aislados con el fin de establecer su grado de homología y su relación filogenética.

P. SÁNCHEZ TORRES, R. HINAREJOS, J. J. TUSET. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Laboratorio de Micología. Ctra. Moncada-Náquera km 4,5 46113 Moncada, Valencia.
E-mail: palomas@ivia.es

Palabras clave: *Spilocaea*, *Venturia*, patogénesis, ITS, rDNA

INTRODUCCIÓN

El níspero (*Eriobotrya japonica* Lindl.) se cultiva en las áreas templadas y su producción ha ido creciendo de forma constante debido a la reconversión varietal y a la incorporación de nuevas técnicas de cultivo. Las variedades más difundidas en España son Tanaka y Algerie. La primera es de maduración tardía que está más expuesta al golpe de sol y presenta frutos de buen calibre y extraordinario sabor. El cultivar Algerie constituye el 95% de la producción del sur de toda la península por su mayor precocidad. Últimamente se están cultivando dos nuevas variedades, Magdall y Golden Nugget, sobre todo en Andalucía.

Entre las enfermedades que atacan al níspero cabe destacar el "moteado o roña". Esta

enfermedad es especialmente importante en la parte occidental de la cuenca mediterránea, donde produce numerosos daños (en algunos casos más de un 50% de la cosecha). Tiene mayor incidencia inmediatamente después de las primeras lluvias otoñales y ataca a los frutos en desarrollo. Los síntomas aparecen a lo largo del todo desarrollo en flores y frutos, si bien el más importante es el daño que parece en las hojas y en los frutos. Los daños de los frutos en algunos casos pueden ser tan severos que producen la pérdida de la cosecha (CABALLERO y FERNÁNDEZ, 2002).

Aunque el moteado o roña es una enfermedad bien conocida, hoy en día existe una enorme controversia en la identificación del patógeno fúngico responsable de esta enfermedad puesto que muchos autores la atribuyen

yen al género *Spilocaea* y otros al género *Fusicladium*. Ambos géneros corresponden a anamorfos de *Venturia* Sacc., género bien conocido puesto que *Venturia inaequalis* y *Venturia pirina* son los causantes del moteado en manzano y peral, respectivamente. *Venturia* se caracteriza por ser un género muy amplio ya que incluye numerosos patógenos de plantas. Este hongo produce sus ascosporas en la primavera en cuerpos fructíferos denominados pseudotecios, creados durante el invierno en las hojas caídas en el suelo y conidios sobre los tejidos verdes atacados durante toda la temporada vegetativa.

La mayoría de los análisis filogenéticos se basan en las repeticiones del DNA ribosómico (rDNA) debido a sus regiones conservadas. Dentro del género *Venturia* se han descrito 52 especies que incluyen los anamorfos *Fusicladium*, *Spilocaea* y *Cladosporium* (SIVANESEN, 1977). Muchos de ellos son patógenos de frutales o de plantas ornamentales y el níspero es especialmente sensible a esta enfermedad. Recientemente la caracterización del rDNA se ha empleado para establecer las relaciones filogenéticas dentro del género *Venturia*, responsable del moteado en numerosos frutales (SCHNABEL *et al.*, 1999). Por otro lado cabe destacar los estudios realizados a nivel taxonómico dentro del género *Fusicladium* (SCHUBERT *et al.*, 2003). Sin embargo, la distinción entre los diferentes anamorfos del género *Venturia* sigue siendo controvertida especialmente el género *Fusicladium* y *Spilocaea*. Las principales características que hasta ahora diferenciaban estos géneros se basan en el modo de proliferación y así, se engloba dentro del género *Fusicladium* aquellos con proliferación de tipo simpodial y dentro de *Spilocaea* aquellos con proliferación de tipo percurrente. (SCHUBERT *et al.*, 2003, SCHUBERT y BRAUN, 2005). Sin embargo, no existen estudios comparativos claros a nivel molecular que nos permitan discriminar estos dos anamorfos.

El objetivo de este trabajo ha sido la identificación y caracterización del patógeno fúngico responsable del moteado del níspero

en el ambiente mediterráneo con el fin de describir sus caracteres morfológicos y su proceso de infección. Asimismo, se describe la caracterización molecular del mismo comparándolo con especies relacionadas (*Venturia* y sus anamorfos) para establecer sus posibles relaciones filogenéticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Vegetal

El material empleado para los diferentes aislamientos consistió en hojas y en frutos de Tanaka y Algerie afectados por moteado y procedentes de diferentes plantaciones de la Comunidad Valenciana.

Los primeros estudios de infectividad se realizaron en plantas de níspero cv Tanaka y cv Algerie. Para los estudios posteriores de patogenicidad y virulencia, se llevó a cabo la inoculación en plantas de níspero cv "Peluche". Dicha variedad se caracteriza por ser plantas de pequeño tamaño con hojas jóvenes de fácil desarrollo en el invernadero lo cual facilita los ensayos.

Hongos empleados

Algunas de las cepas fúngicas empleadas fueron adquiridas a través de la Colección de Cultivo Tipo CBS: *Fusicladium carpophilum* (CBS 497.62) (Fc), *Spilocaea pomi* (CBS 180.47) (Sp) *Venturia inaequalis* (CBS 595.70) (Vi) and *Venturia pirina* (CBS 331.65) (Vp). Una cepa aislada a partir de níspero y amablemente cedida por el Dr Le Cam: *Spilocaea eriobotryae* (Se). El resto de los aislados corresponden a dos variedades de níspero cultivado en el Mediterráneo, Tanaka (NSH) (Serra-Valencia) y Algerie (NCH) (Comarca de Callosa d'en Sarriá-Alicante). El aislamiento de los hongos presentes en hojas y frutos de níspero con síntomas de moteado se realizó mediante pases sucesivos, primero en agar agua, y posteriormente en medio PDA suplementado con estreptomycinina 100 µg/ml para prevenir las contaminaciones de origen bacteriano, hasta la obtención de micelios monospóricos. Todas las cepas se

Cuadro 1. Secuencias de los distintos cebadores empleados en este estudio.

Nombre del Cebador	Secuencia
ITS1	(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
18S-Rev	5'-AGGGTTCGATTCCGGAGAG-3'
18S-For	5'-GTGTTGAGTCAAATTAAGCCG-3'
28Y	5'-ATTTGCCTTAGTAACGGCGAG-3'
28Z	5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGAC-3'
VCF1	5'-ATGGGTTAGCCTTCGGGCGC-3'
VCF2	5'-CTTGTAATATAGGTTTCGG-3'

mantuvieron en agar patata (PDA) (Difco Laboratories, Detroit) suplementado con estreptomycin a 8° C.

El estudio de los caracteres morfológicos de dichos cultivos puros se realizó mediante técnicas taxonómicas clásicas y su comparación con literatura especializada (BRIOSI y CAVARA, 1892; SCHUBERT *et al.*, 2003).

Estudio de patogenicidad

En todas las experiencias de infección, se utilizaron suspensiones de esporas obtenidas a partir de placas de PDA previamente inoculadas con cada uno de los aislados y crecidas durante 45 días a 21°C hasta conseguir suficiente masa de micelio esporulado. El micelio se rascó de la placa de manera superficial para así obtener una suspensión de conidias en agua estéril y Tween al 0.5% con el fin de evitar que las esporas se agregaran entre si y facilitar su adherencia a la superficie de las hojas. Dicha suspensión se observó al microscopio y se cuantificó mediante un hematocitómetro. Se empleó una concentración de 10⁵ esporas/ml que fueron distribuidas sobre la superficie de las hojas mediante spray. Las plantas seleccionadas para el proceso fueron aquellas que presentaban hojas jóvenes de unos 7 cm de longitud ya que son las que han resultado más susceptibles al proceso de infección.

Las plantas de níspero una vez inoculadas, se mantuvieron en un túnel del invernadero con 100 % de humedad durante una semana y posteriormente se mantuvieron en el invernadero a 21° C a humedad ambiental.

Obtención de DNA genómico

Para la caracterización molecular se llevó a cabo el crecimiento de los aislados puros en placas de PDA durante 3 semanas a 21° C hasta obtener colonias de más de 1 cm de diámetro que permitiera disponer de suficiente micelio para una posterior extracción de DNA genómico. El DNA fue obtenido tal y como había sido descrito previamente por LE CAM *et al.* (2002) y el DNA se mantuvo en TE a -20° hasta su posterior utilización en reacciones de PCR.

Amplificaciones por PCR

Se emplearon cebadores ITS1 e ITS4 para amplificar la región ITS. Los cebadores 18S-Rev y 18S-For se emplearon para amplificar la región 18S. Los cebadores 28Y and 28Z fueron empleados para amplificar la región 28S rRNA. Se diseñaron cebadores específicos VCF1 y VCF2 dentro de la región ITS del género *Venturia* y especies relacionadas para detectar específicamente *Venturia* y sus anamorfos en muestras mezcladas. (Véase Cuadro 1).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 100 µl conteniendo 1 µl (20 a 60 ng) de DNA molde; 1 µM cada cebador; 200 µM cada dNTP; 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, MD); Los parámetros de la reacción fueron 94° C durante 5 min seguida por 30 ciclos de 94° C durante 30 s, 52° C 45 s, y 72° C durante 1 min. Los productos obtenidos fueron analizados por electroforesis en 1.5% agarosa en tampón TAE.

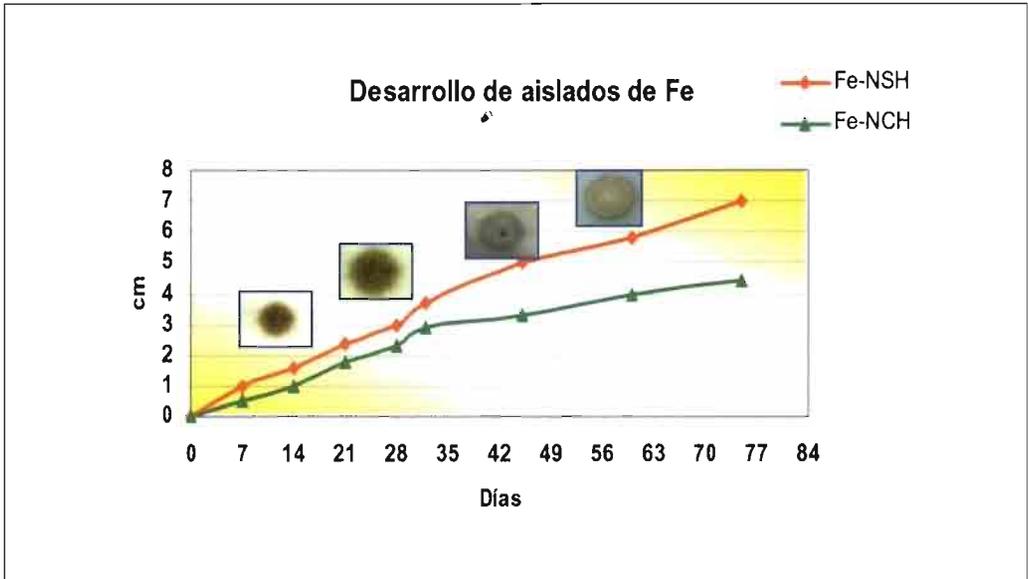


Figura 1. Diámetro de crecimiento de ambos aislados de *F. eriobotryae* (NSH y NCH) crecidos en medio sintético de PDA a 21°C.

Secuenciación de DNA

Los productos de PCR se purificaron empleando el kit Ultra Clean™ PCR Clean-up (MoBio, Lan Inc., California) y se secuenciaron parcialmente empleando los cebadores ITS1, ITS4, 18S-Rev, VCF-2.

La secuenciación propiamente dicha se realizó mediante el método de PROBER *et al.*, (1987) en un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Las secuencias de DNA se compararon con aquellas ya depositadas en la base de datos EMBL siguiendo en el algoritmo WU-BLAST (Washington University-Basic Local Alignment Search Tool (ALTSCHUL y GISH, 1996).

RESULTADOS

Aislamiento e identificación del patógeno fúngico

Entre los hongos encontrados cabe destacar la frecuente presencia de hongos pertenecientes al género *Cladosporium spp.* y *Alternaria spp.*, ambos parásitos facultativos con un comportamiento generalmente sapro-

fítico, que debido a su rápido crecimiento dificultaron el aislamiento de las colonias fúngicas de nuestro interés caracterizadas por una gran lentitud de crecimiento. Los aislados de interés fueron posteriormente incubados a 21° C durante 4 semanas para favorecer su esporulación.

“In vivo” este hongo se caracteriza por un lento desarrollo de su micelio debido a su carácter subcuticular de manera que cuando infecta sólo está presente en el tejido epidérmico y algunas células inferiores al mismo, donde el micelio del hongo encuentra el sustrato ideal. Bajo la cutícula, y a expensas de la epidermis, se producen las manchas en los estomas, que más tarde, si la humedad es apropiada, irrumpen al exterior y dan lugar a fructificaciones del hongo lo que hace que no exista mucho micelio aéreo. El micelio desarrollado en placa mostró el mismo desarrollo lento, tal y como se muestra en la Figura 1, donde sólo alcanza a cubrir la placa petri después de más de dos meses y medio de crecimiento. Las conidias son solitarias, rectas, de forma variable, que van de típica-

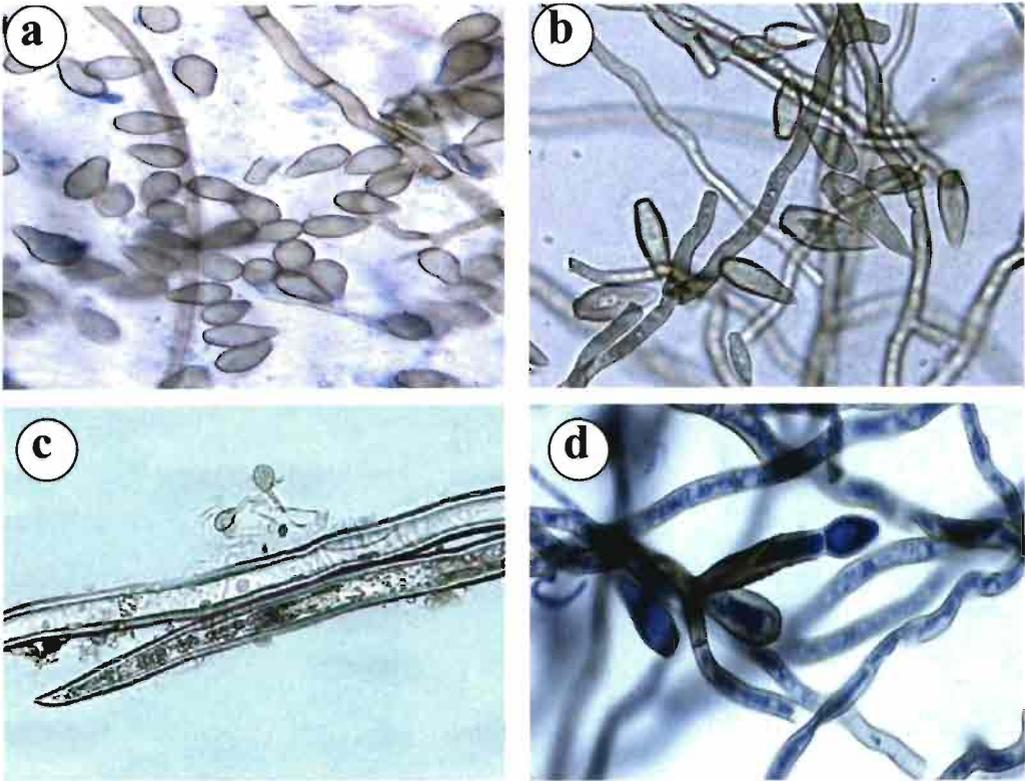


Figura 2. Conidias jóvenes de *F. erobotryae* (Fe-NSH) crecido en PDA (a). Conidias adultas de *F. erobotryae* (Fe-NSH) crecido en PDA (b). Conidias de *F. erobotryae* germinando próximas al tricoma durante la infección en níspero (c). Micelio típicamente septado con conidiogénesis de tipo percurrente (d).

mente ovoides a obpiriformes, y pueden presentar en algunos casos un septo y cuyo tamaño oscila entre $11,63 \pm 0,83 \times 6,18 \pm 0,58 \mu\text{m}$ en etapas jóvenes y $16,30 \pm 2,52 \times 6,3 \pm 0,37 \mu\text{m}$ en etapas adultas (Figura 2-b). Además se caracterizan por presentar un estrechamiento en la punta y aspecto redondeado en la zona del ápice. Para su germinación requieren alto grado de humedad de ahí que normalmente la germinación de las conidias ocurra muy próxima a los tricomas donde existe alta concentración de humedad. (Figura 2-c).

La conidiogénesis observada de forma más frecuente corresponde a una de tipo percurrente (Figura 2-d) si bien también pudo observarse en algunos casos proliferación de tipo simpodial. El conidióforo presentó un

tamaño que osciló entre $9,59 \pm 2,02 \times 4,57 \pm 0,68 \mu\text{m}$ (joven) y $17,46 \pm 1,90 \times 4,42 \pm 0,52 \mu\text{m}$ (adulto) (Figura 3). La conidiogénesis percurrente en algunos casos fue muy manifiesta, apreciándose claramente las cicatrices de las conidias ya formadas y liberadas. (Figura 3-d).

Patogénesis

Producción de daños

La inoculación de plantas de níspero cv Tanaka y cv Algerie realizada en un pequeño número de plantas confirmó la capacidad infectiva de nuestros aislados. Posteriormente se realizó la inoculación de plantas de níspero cv "Peluche" (Figura 4-a) que mostró la presencia de lesiones a los 21 días después de la inoculación (dpi) en forma de manchas

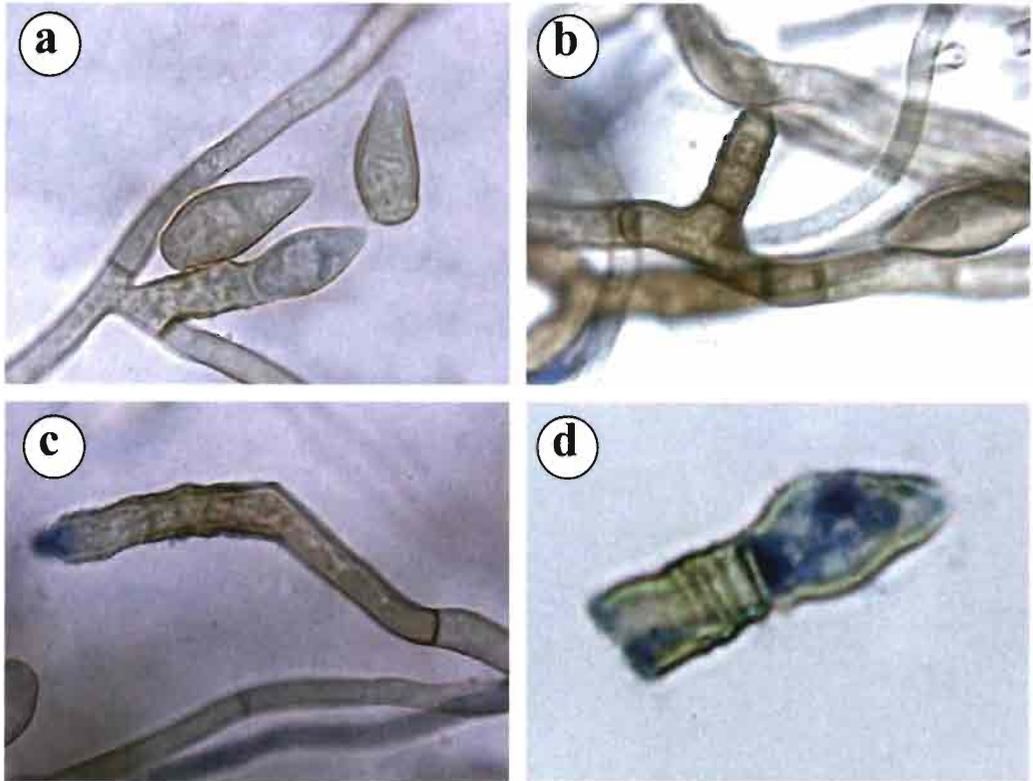


Figura 3. Distintos estadios de conidiogénesis de *F. erobotryae* típicamente percurrente con incremento del conidióforo (a, b y c). Cicatrices en conidióforo como resultado de conidiaciones previas (d).

cloróticas a lo largo de las hojas (Figura 4-b), y que se hicieron más manifiestas a los 45 dpi (Figura 4-c y 4-d) en forma de manchas cloróticas de color marrón oliváceo de aspecto aterciopelado y forma estrellada con muestras evidentes de presencia de esporas.

Este sistema ha permitido la confirmación de que los hongos aislados son responsables del moteado del níspero al reproducir los síntomas del mismo y desarrollando por tanto un sistema de infección *in vivo* eficaz.

Comparación de aislados

Siguiendo el proceso anteriormente descrito, se compararon los distintos aislados de *F. erobotryae* (NSH y NCH) con especies muy relacionadas como *V. inaequalis* (Vi), *V. pirina* (Vp), *S. pomi* (Sp), *S. erobotryae* (Se), *Fusicladium carpophilum* (Fc), estu-

diando tanto los síntomas como el proceso de infección.

Se llevaron a cabo tres experimentos independientes que permitieron constatar que *V. inaequalis* y *F. carpophilum* fueron incapaces de infectar níspero cv “Peluche” en las condiciones empleadas, mientras que *V. pirina*, *S. pomi* and *S. erobotryae* mostraron diferentes síntomas de moteado, aunque dichos síntomas difirieron de aquellos causados por los aislados identificados como *Fusicladium* y su incidencia fue claramente menor (Figura 5).

En términos de virulencia podemos destacar las grandes diferencias observadas entre los dos aislados de *Fusicladium* obtenidos en este trabajo. *F. erobotryae*-NSH mostró síntomas más severos que *F. erobotryae*-NCH,

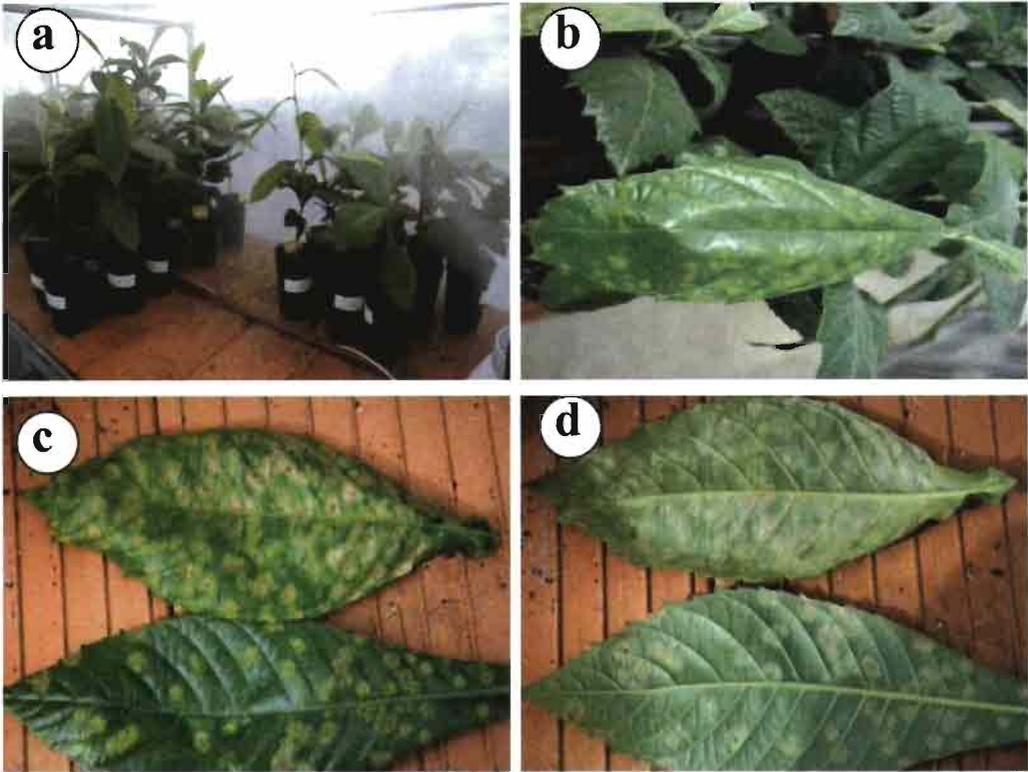


Figura 4. Plantas inoculadas con *F. eriobotryae* (NSH) que se mantuvieron en invernadero a 100% de humedad durante 1 semana (a). Primeras lesiones después de 21 dpi con aspecto de manchas cloróticas (b). Haz y envés de hojas después de 45 dpi como manchas cloróticas que aumentan a medida que progresa la enfermedad adquiriendo un aspecto oliváceo y aterciopelado debido a la producción de esporas asexuales y con forma estrellada (c y d).

ya que el número de hojas afectadas por planta así como la incidencia de las manchas en las hojas fue claramente superior. Este hecho fue también patente por la diferencia observada entre estos dos aislados de *Fusicladium* en la esporulación y así mientras Fe-NSH mostró esporas en ambas partes de la hoja (haz y envés), Fe-NCH sólo en el haz. (Figura 6).

Caracterización molecular de *F. eriobotryae*

Con el fin de elucidar las relaciones existentes entre nuestros aislados y *V. inaequalis* y otras especies relacionadas se ha llevado a cabo un análisis de la variación de secuencias dentro de la región ITS de especies representativas de estos dos grupos. La

caracterización molecular se ha realizado también comparando distintas regiones que incluyen D1/D2 así como la región del 18S entre todas las especies estudiadas con el fin de establecer su posible homología.

Empleamos distinta combinación de cebadores así como nuevos cebadores diseñados basándonos en la homología de secuencias presentes en la base de datos. La región ITS no mostró diferencias de tamaño en los fragmentos obtenidos por PCR entre todos los aislados cuando empleamos los cebadores ITS1 e ITS4. Empleando los cebadores específicos, VCF1 y VCF2 dentro de la región ITS, se observó que éramos capaces de obtener fragmentos para todas ellas excepto para *F. carophillum* y *V. pirina* que tan sólo pudieron

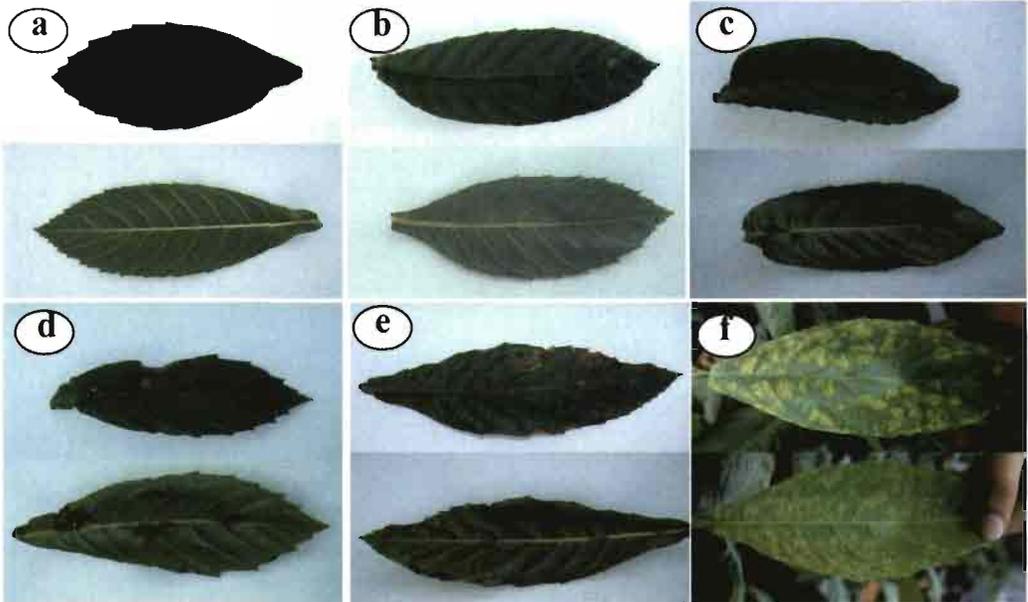


Figura 5. Síntomas en hojas de níspero después de la infección con (a): Fc (b): Vi (sin moteado) y (c) Sp, (d) Se (e) Vp y (f) Fe-NSH con diferentes síntomas de moteado.

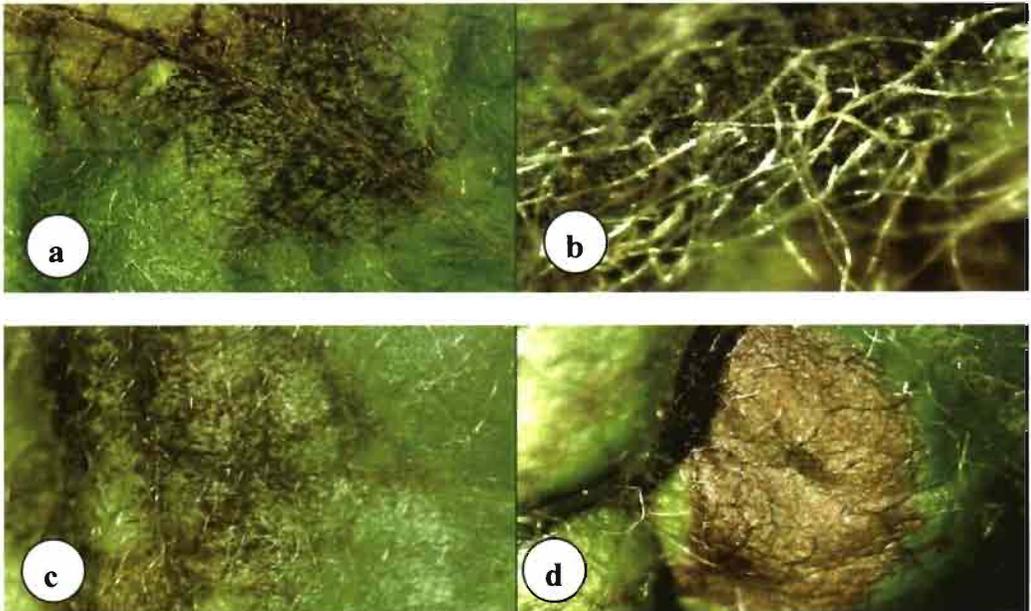


Figura 6. Esporulación observada en haz (a y c) o en el envés (b y d) en hojas de níspero cv "Peluche" infectado con *F. eriotriyae* NSH (a y b) o NCH (c y d).

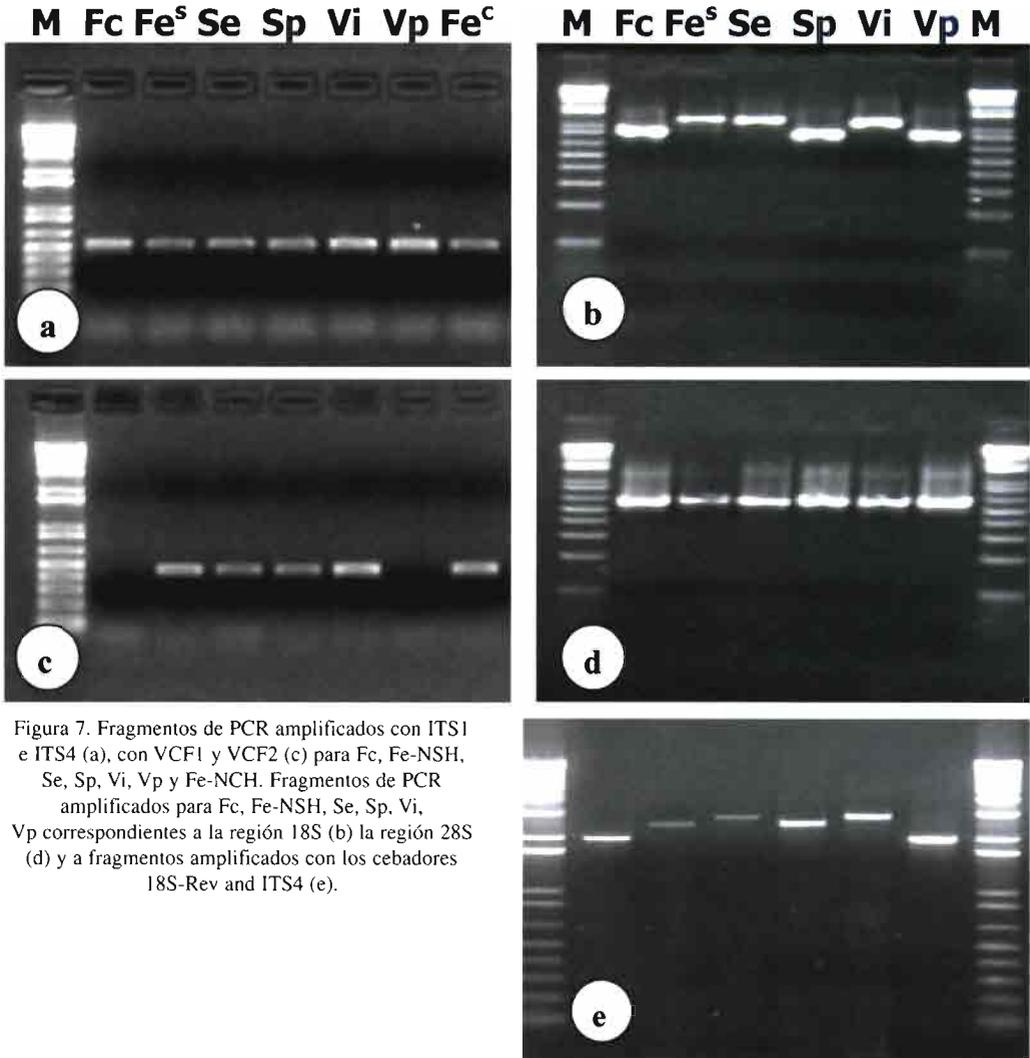


Figura 7. Fragmentos de PCR amplificados con ITS1 e ITS4 (a), con VCF1 y VCF2 (c) para Fc, Fe-NSH, Se, Sp, Vi, Vp y Fe-NCH. Fragmentos de PCR amplificados para Fc, Fe-NSH, Se, Sp, Vi, Vp correspondientes a la región 18S (b) la región 28S (d) y a fragmentos amplificados con los cebadores 18S-Rev and ITS4 (e).

ser amplificadas con los cebadores ITS1 e ITS4 (Figura.7). El análisis de las secuencias ITS de todos ellos revelaron diferente grado de homología. Sorprendentemente las secuencias obtenidas para Fe-S y Vi fueron idénticas pero diferentes de Se, Vp y Fc lo que apoya nuestra identificación morfológica previa en la identificación de nuestros aislados como *Fusicladium* y no *Spilocaea*.

El estudio de las región D1/D2 reveló un tamaño idéntico para todos los aislados

mientras que si se pudo observar diferencias muy evidentes para la región del 18S (Figura 7 b y d). Teniendo en cuenta esta particularidad, se obtuvo un fragmento específico que abarcaba desde la región 18S hasta el ITS utilizando los cebadores 18S-Rev en el extremo 5' y VCF2 o ITS4 en el extremo 3' que dio lugar a una banda específica para cada especie (Figura 7-e). La secuenciación de este fragmento completo permitirá un mejor conocimiento de las relaciones filoge-

néticas existentes entre todas las cepas estudiadas y en particular entre los distintos aislados con el fin de poder establecer las posibles diferencias entre ellas.

DISCUSIÓN

Las investigaciones sobre el moteado del níspero son escasas y menos se sabe aún sobre las especies de *Fusicladium* spp. que infectan al níspero. Dicha enfermedad afecta en distintos estadios de desarrollo de la planta, pero la más perjudicial es la que afecta a los frutos ya que estos se deprecian y conllevan numerosas pérdidas. Esta situación es particularmente llamativa en el área del Mediterráneo lugar donde se cultiva el níspero en mayor extensión en el territorio español.

Uno de los aspectos de esta enfermedad que ha suscitado más interés entre los investigadores, ha sido la correcta identificación del patógeno responsable ya que todavía existe una gran controversia entre dos anamorfos del género *Venturia*, *Fusicladium* y *Spilocaea* (SCHNABEL *et al.*, 1999; BRAUN *et al.*, 2002; SCHUBERT *et al.*, 2003) Algunos autores identifican al responsable del moteado del níspero dentro del género *Spilocaea* (B. Le Cam, comunicación personal). Sin embargo, la forma más común empleada es la del género *Fusicladium*. Con este trabajo se da un primer paso para responder a esta cuestión, mediante la caracterización tanto morfológica como molecular de los aislados obtenidos de nísperos afectados por el moteado.

Este hongo se caracteriza por un lento desarrollo miceliar debido a su crecimiento subcuticular, de manera que cuando infecta, sólo está presente en el tejido epidérmico. Este hecho dificulta enormemente su aislamiento de forma pura, al competir con otros hongos que crecen de manera saprofita y a mucha mayor velocidad. Los conidios son características: solitarios, rectos, de forma variable, y desde de típicamente ovoides a obpiriformes. A la vista de estos caracteres, el patógeno fúngico responsable del motea-

do en el níspero fue identificado como *F. eriobotryae*. Su inclusión dentro del género *Fusicladium* y no en el género *Spilocaea* se realizó teniendo la hipótesis apoyada por algunos autores donde se promueve la existencia de un único género que engloba ambos anamorfos (tanto *Fusicladium* como *Spilocaea*) y que en este caso corresponde al género *Fusicladium* por antigüedad taxonómica (BRAUN *et al.*, 2002; BECK *et al.*, 2005).

Los síntomas de moteado encontrados en nísperos del área Mediterránea española fueron muy acusados tanto en las hojas como en el fruto, apareciendo en forma de manchas verdes o parduzcas. La lesión producida es normalmente circular y su tamaño aumenta a medida que avanza la enfermedad volviéndose olivácea y aterciopelada debido a la presencia de esporas. (SÁNCHEZ-TORRES *et al.*, enviado).

Los estudios de la patogenicidad llevados a cabo utilizando los aislados de *F. eriobotryae* como las especies relacionadas, pusieron de manifiesto a efectividad del sistema de infección *in vivo*. Los resultados obtenidos confirmaron la especificidad de huésped para *F. eriobotryae* (NSH y NCH), *V. inaequalis* y *F. carpophilum*, mientras que *V. pirina*, *S. pomi* que si fueron capaces de infectar al níspero, aunque sus síntomas fueron diferentes y mostraban mucha menor incidencia. La capacidad infectiva *S. eriobotryae* puede deberse a que se trate en realidad de otra cepa más de la especie *F. eriobotryae* si tenemos en cuenta la razón anteriormente expuesta de existencia de un sólo género. Estos resultados sugieren que algunas especies, *S. pomi* y *V. pirina* muestran mayor especificidad de huésped que otros, como es el caso de *V. inaequalis* y *F. carpophilum*. De cualquier forma, este proceso de infección sólo se ha observado "*in vivo*" en ensayos en invernadero y no de manera natural, ya que todos los aislados identificados en muestras con moteado de campo correspondieron a *F. eriobotryae*.

La importancia de la puesta a punto de un sistema *in vivo* de infección radica no sólo

en la confirmación de *F. eriobotryae* como responsable del moteado sino en que este sistema está siendo empleado para el estudio del proceso de infección junto con la identificación de variedades de níspero que sean tolerantes o resistentes al moteado, con la importancia económica que eso conlleva. El estudio del proceso de infección, gracias a dicho sistema, podría facilitar en un futuro el desarrollo de nuevos métodos de control más efectivos.

Por otra parte, y puesto que los caracteres morfológicos estudiados no resultaron consistentes para establecer diferencias entre los aislados obtenidos a partir de las distintas variedades de níspero se recurrió al empleo de técnicas moleculares, así como a ensayos de patogenicidad que permitieran establecer los distintos grados de virulencia. Dichas aproximaciones revelaron diferencias significativas entre los distintos aislados si bien dichas diferencias no se han podido correlacionar hasta el momento ni con el lugar de procedencia ni con la variedad de níspero de la que fue aislado. En estos momentos se está ampliando el número de aislados con el fin de comprobar la existencia de alguna posible correlación.

La caracterización molecular llevada a cabo comparando la región D1/D2, la región ITS y 18S entre todas las especies con el fin de establecer su relación filogenética ha permitido claramente diferenciar a *V. inaequalis* y *V. pirina* responsables de moteado de manzana y pera, respectivamente, de los aislados

de níspero. Si bien la región ITS no mostró diferencias entre Vi e Fe si lo hizo con Vp, confirmando los resultados obtenido previamente por LE CAM *et al.* (2001, 2002). Las diferencias observadas de tamaño de fragmento amplificado a nivel de la región 18S podrían ser coincidentes con la presencia de un intrón tal y como ya se describió previamente por SCHNABEL *et al.* (1999). Si bien este sería un rasgo más para diferenciar las distintas especies que se encuentran más alejadas filogenéticamente, nos permite además distinguir de forma clara *V. inaequalis* de *F. eriobotryae* gracias a las diferencias en secuencia encontradas. Hasta la fecha no se disponían de muchas secuencias en las bases de datos relacionadas con el moteado del níspero, por lo que este trabajo supone la primera información desde un punto de vista molecular, del patógeno fúngico responsable del moteado del níspero del área del Mediterráneo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado gracias a un proyecto del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Queremos agradecer la contribución de la Dra. M Bades por sus útiles consejos, al Dr Le Cam por proporcionarnos el aislado de *S. eriobotryae*. A D. Navarro por suministrarnos gran parte del material de nísperos con síntomas de moteado. También queremos agradecer A. D. Gisbert por excelente ayuda técnica.

ABSTRACT

SÁNCHEZ TORRES P., R. HINAREJOS, J. J. TUSET. 2007. *Fusicladium eriobotryae*: Fungal pathogen causing Spanish Mediterranean loquat scab. *Bol. San. Veg. Plagas*, 33: 87-98.

Fungal pathogen causing Spanish Mediterranean loquat scab has been isolated and has been identified as *Fusicladium eriobotryae* according to conidial state and genetic characterisation. Mediterranean loquat scab symptoms are generally most noticeable and serious on both sides of leaves and fruit as green to olive-brown spots. The lesion is usually circular and as it increases in size it becomes olive-colored and velvety due to production of asexual spores. Scab symptoms have been reproduced by developing an *in vivo* infection system. Following this strategy it has been compared two isolates *F. eriobotryae* (NSH and NCH) to different isolates closely related such as *Venturia inaequalis*, *Venturia pirina*, *Spilocaea pomi*, *Spilocaea eriobotryae* and *Fusicladium carpophi-*

lum, studying symptoms and infection process. Molecular characterisation has also been done comparing rDNA regions from all strains dealing to establish their putative homology and phylogenetic relationship.

Key words: *Spilocaea*, *Venturia*, patogénesis, ITS, Rdna.

REFERENCIAS

- ALTSCHUL, S. F. and GISH, W. 1996. Local alignment statistics. *Meth. Enzymol.*, **266**, 460-480.
- BECK, A., RITSCHEL, A., SCHUBERT, K., BRAUN, U., TRIEBEL, D. 2005. Phylogenetic relationships of the anamorphic genus *Fusicladium* s. lat. as inferred by ITS nrDNA data. *Mycological Progress*, **4**(2): 111-116.
- BRAUN, U., RITSCHEL, A., SCHUBERT, K. 2002. Proposal to conserve the generic name *Fusicladium* against *Spilocaea* (Hyphomycetes). *Taxon*, **51**: 557.
- BRIOSI, G.; CAVARA, F., 1892. *I Funghi Parassiti delle Piante Coltivate od Utili* 7-8, no. **186**
- CABALLERO P., FERNÁNDEZ M^a A. 2002. "Loquat, Production and Market". First International Symposium on Loquat. Moncada. Abril 2002. Actas, pag: 11-15
- LE CAM, B., DEVAUX, M., and PARISI, L. 2001. Specific polymerase chain reaction identification of *Venturia nashicola* using internally transcribed spacer region in the ribosomal DNA. *Phytopathology*, **91**: 900-904.
- LE CAM, B., PARISI, L., ARENE, L. 2002. Evidence of two formae speciales in *Venturia inaequalis*, responsible for apple and Pyracantha scab. *Phytopathology*, **92**: 314-320.
- PROBER, J. M., TRAINOR, G. L., DAM, R. J., HOBBS, F. W., ROBERTSON, C. W., AGURSKY, R. J., COCUZZA, A. J., JENSEN, M. A. and BAUMEISTER, K. 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chainterminating dideoxynucleotides. *Science*, **238**: 336-341.
- SÁNCHEZ-TORRES, P. HINAREJOS, R., J. J. TUSET. 2006. Identification and characterisation of *Fusicladium eriobotryae*: fungal pathogen causing mediterranean loquat scab. *Acta Horticul.*, (submitted).
- SCHNABEL, G., SCHNABEL, E. L., and JONES, A. L. 1999. Characterization of ribosomal DNA from *Venturia inaequalis* and its phylogenetic relationship to rDNA from other tree-fruit *Venturia* species. *Phytopathology*, **89**: 100-108.
- SCHUBERT, K., BRAUN, U. 2005. Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. Lat1. Sepcies reallocated to *Fusicladium*, *Parastenella*, *Passalora*, *Pseudocercospora* and *Stenella*. *Mycological Progress*, **4**(2): 101-109.
- SCHUBERT, K., RITSCHEL, A., BRAUN, U. 2003. A monograph of *Fusicladium* s.lat.(Hyphomycetes). *Schlechtendalia*, **9**: 1-132.
- SIVANESAN, A. 1977. The Taxonomy and Pathology of *Venturia* Species. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein.

(Recepción: 8 noviembre 2006)

(Aceptación: 4 diciembre 2006)