

La necrosis foliar causada por *Mycosphaerella nawae* Hiura & Ikata: una nueva enfermedad del caqui (*Diospyros kaki* L. f.) en España

M. BERBEGAL, A. PÉREZ-SIERRA, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ

En agosto de 2008, se detectaron unos síntomas foliares nunca antes observados en plantaciones comerciales de caqui en la provincia de Valencia. Los objetivos del presente trabajo fueron tipificar la sintomatología de la nueva enfermedad e identificar su agente causal. Para ello, se prospectaron 19 parcelas situadas en diferentes localidades de la comarca de La Ribera Alta. A partir de estas observaciones se caracterizó el síndrome de la enfermedad, consistente en la aparición de clorosis y zonas necróticas en las hojas, defoliación, madurez y abscisión anticipada de los frutos. De las muestras foliares se aislaron *Phomopsis* sp., *Pestalotiopsis microspora* y *Mycosphaerella nawae*. Los resultados de los ensayos de patogenicidad realizados con aislados representativos de las tres especies demostraron que *M. nawae* es el agente causal de la nueva enfermedad.

M. BERBEGAL. Fundación Agroalimed-Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. mobermar@etsia.upv.es
A. PÉREZ-SIERRA, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

Palabras clave: Rojo brillante, abscisión de frutos.

INTRODUCCIÓN

En España la producción de caqui (*Diospyros kaki* L. f.) ha sufrido un considerable incremento desde 1992 (LLACER y BADENES, 2002). La Comunidad Valenciana, con una producción aproximada de 50.000 t anuales, representa el 94% de la superficie total de caqui en España seguida por Andalucía (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, <http://www.marm.es>, 2008). La expansión del caqui en la Comunidad Valenciana se ha visto favorecida por su elevada rentabilidad y el retroceso experimentado por los frutales de hueso en los últimos años (CLIMENT y LLACER, 2001; LLACER y BADENES, 2002). A estos factores, se une el interés que ha despertado el cv. Rojo Brillante, mutación espontánea de la antigua variedad autóctona "Cristalino", y por el per-

feccionamiento de técnicas postcosecha que permiten mejorar su comercialización (ARNAL y DEL RÍO, 2003; SALVADOR *et al.*, 2004). Esta producción se concentra principalmente en la comarca valenciana de La Ribera Alta (Figura 1), donde el 94% de las plantaciones son del cv. Rojo Brillante injertado sobre *Diospyros lotus* L. f.

En agosto de 2008, tras una primavera inusualmente lluviosa, se detectaron unos síntomas foliares nunca antes observados en parcelas de caqui situadas en la comarca de La Ribera Alta. Estos síntomas incluían clorosis, manchas necróticas y fuerte defoliación e iban acompañadas de madurez y abscisión anticipada de los frutos, llegando a producir unas pérdidas globales en la comarca del 20% de la cosecha estimada.

Hasta el momento, las enfermedades foliares detectadas en caqui en España no ha-

bían tenido demasiada trascendencia, principalmente por no encontrarse asociadas a daños directos sobre la cosecha. En 1998, se detectó una enfermedad foliar causada por *Pestalotiopsis theae* (Saw.) Stey. en parcelas de caqui situadas en la provincia de Huelva (TUSET *et al.*, 1999). Los síntomas consistían en lesiones circulares con anillo que podían aparecer aisladas en las hojas y que cuando afectaban a más de un tercio de su superficie podían provocar una defoliación anticipada. *P. theae* se ha descrito también como agente causal del “leaf blight” en Japón (YASUDA *et al.*, 2003). Recientemente, se detectó por primera vez *Pestalotiopsis diospyri* Sidow & P. Sidow como agente implicado en la aparición de áreas necróticas en cálices (“calyx blight”) en plantaciones de caqui en Huelva (BLANCO *et al.*, 2008). *P. diospyri* se ha descrito como agente causal de “leaf blight” y podredumbre de frutos en Corea del Sur (KWON *et al.*, 2004).

En los principales países productores de caqui existen referencias sobre otras enfermedades foliares causadas por hongos. *Mycosphaerella nawae* Hiura & Ikata se ha descrito como agente causal de la mancha foliar circular del caqui en Japón (ABE *et al.*, 1996) y la República de Corea (KWON *et al.*, 1995; 2004), donde esta enfermedad provocó graves pérdidas durante la década de los noventa, no teniendo en la actualidad una incidencia importante. También se ha descrito en Brasil, China o Taiwán, entre otros países, la enfermedad de la mancha foliar angular causada por *Pseudocercospora kaki* Goh & Hsieh (KANG *et al.*, 1997; DAVID, 2000). La antracnosis, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., se ha citado en la República de Corea como una enfermedad importante en caqui, sobre todo por los daños que ocasiona en los frutos aunque también puede provocar lesiones en las hojas (KWON *et al.*, 2007).

En el presente estudio se aborda la caracterización del síndrome de esta nueva enfermedad así como la identificación de su agente causal. Una parte de este trabajo ha

sido publicada recientemente (BERBEGAL *et al.*, 2010).

MATERIAL Y MÉTODOS

Prospección de parcelas y procesado de muestras

En 2008 se prospectaron secuencialmente un total de 19 parcelas de caqui (Cuadro 1) situadas en diferentes municipios de la comarca de La Ribera Alta en Valencia (Figura 1). En cada parcela se anotó la sintomatología observada y se tomaron muestras de hojas afectadas para su

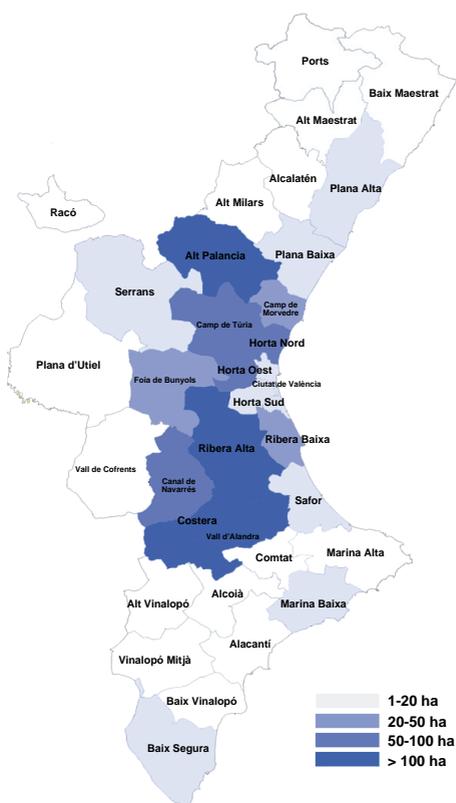


Figura 1. Hectáreas cultivadas de caqui por comarcas en la Comunidad Valenciana, adaptado de Jareño (2009) a partir de los datos de la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación, www.agricultura.gva.es, 2007

Cuadro 1. Parcelas prospectadas y géneros fúngicos detectados

Localidad	Fecha de prospección	<i>Phomopsis</i>	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Mycosphaerella</i>
L'Alcúdia	11/11/08	+	-	+
L'Alcúdia	11/11/08	+	+	-
L'Alcúdia	18/11/08	+	+	-
L'Alcúdia	18/11/08	+	-	+
L'Alcúdia	18/11/08	+	-	-
L'Alcúdia	20/11/08	+	+	+
Alginet	20/11/08	-	+	+
Alginet	20/11/08	+	+	+
Alzira	12/11/08	+	+	+
Alzira	20/11/08	+	+	+
Alzira	20/11/08	+	-	-
Alzira	20/11/08	+	-	+
Benimodo	11/11/08	-	-	-
Benimodo	11/11/08	+	-	+
Benimodo	12/11/08	+	+	+
Benimuslem	12/11/08	+	-	+
Carcaixent	12/11/08	+	+	+
Guadassuar	12/11/08	+	+	+
Guadassuar	18/11/08	-	-	+
Total de parcelas de las que se aislaron los diferentes hongos		16	10	14

+/-: indica la detección positiva o negativa de cada uno de los géneros fúngicos en las parcelas de caqui prospectadas

posterior análisis en el laboratorio. El material vegetal se desinfectó con hipoclorito sódico (1,5% de cloro activo) durante un minuto, seguido de dos baños con agua estéril y se sembraron pequeños fragmentos del borde de las lesiones en placas Petri con medio PDAS (39 g de patata-dextrosa-agar, Biokar Diagnostics; 0,5 g de sulfato de estreptomycin, Sigma-Aldrich; 1 L de agua destilada). Las placas de aislamiento se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 5-7 días. De las colonias resultantes se extrajeron puntas hifales que se repicaron a medio PDA (39 g de patata-dextrosa-agar, Biokar Diagnostics; 1 L de agua destilada) para su posterior identificación.

De algunas parcelas se tomaron semanalmente muestras de hojas afectadas defoliadas, que habían permanecido en el suelo desde agosto, cuando aparecieron los primeros síntomas, para hacer un seguimiento de

la formación de cuerpos fructíferos en las lesiones. A partir del momento en que se observaron estructuras fúngicas maduras en las lesiones se cortaron fragmentos de estas lesiones que, tras humedecerlos sumergiéndolos durante 5 minutos en agua estéril, se pegaron con vaselina en tapas de placas Petri con medio PDAS y se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 7 días. Las colonias incipientes observadas en la superficie del medio de cultivo se repicaron a medio PDA, para proceder a su identificación.

Identificación de especies fúngicas

Identificación morfológica

La identificación morfológica de los aislados se hizo a partir de los cultivos puros de tres géneros fúngicos que se obtuvieron

consistentemente y que se consideraron, por las referencias existentes y/o por el tipo de sintomatología foliar, como potencialmente asociados a la nueva enfermedad del caqui: *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* y *Mycosphaerella*. Para inducir la esporulación se hicieron crecer en diferentes medios de cultivo: dos aislados de *Pestalotiopsis* (Pe1 y Pe2, procedentes de parcelas localizadas en Carlet y L'Alcúdia, respectivamente) se incubaron en PDA en oscuridad a 25 °C durante tres semanas. En el caso de *Phomopsis*, dos aislados (P1 y P2, de parcelas localizadas en L'Alcúdia y Guadassuar, respectivamente) se incubaron en PCA (20 g de patata; 20 g de zanahoria; 15 g de agar, Oxoid; 1 L de agua destilada) con granos de trigo previamente esterilizados, en fotoperiodo 12 h a 25°C durante dos meses. Finalmente, cinco aislados representativos de *Mycosphaerella* (M1 y M2 obtenidos de parcelas localizadas en Carlet, M3 de Alzira, M4 de Guadassuar y M5 de L'Alcudia) se sembraron en diferentes medios: PCA + trigo, MEA (50 g agar extracto de malta, Oxoid; 1 L de agua destilada), agar agua (19 g de agar, Oxoid; 1 L de agua destilada) + hojas de clavel, agar agua + acículas de pino, y agar agua + hojas de caqui, en fotoperiodo 12 h a 25 °C durante dos meses.

Con el fin de identificar a nivel de especie los aislados de *Mycosphaerella* obtenidos en la zona de estudio, se compararon los caracteres morfológicos de los cinco aislados seleccionados con los de un aislado de *M. nawae* procedente de plantaciones de caqui afectadas por la enfermedad de la mancha foliar circular en la República de Corea proporcionado por el Dr. Chang-Seuk Park (College of Agriculture, Gyeongsang National University, Chinju, Korea). Adicionalmente, los cinco aislados representativos se sembraron en cuatro placas con PDA que se incubaron en oscuridad a 25 °C para calcular el ratio de crecimiento diario. Tras cuatro semanas de incubación se midió el crecimiento miceliar de los aislados en dos diámetros perpendiculares repitiéndose el experimento dos veces.

Identificación molecular

La identificación molecular se realizó con los mismos aislados seleccionados de cada género fúngico y se llevó a cabo a partir de ADN genómico obtenido del micelio utilizando el kit comercial "EZNA Plant DNA" (Omega). Se amplificó la región ITS del ADN ribosómico mediante la técnica PCR con los cebadores ITS1 e ITS4. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador programable (PTC 200, MJ Research), con las condiciones siguientes: 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, seguidos de 10 min a 72°C de extensión final de los iniciadores. La purificación de los fragmentos amplificados por PCR se realizó con el kit "high pure PCR product purification" (Roche), siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Los fragmentos purificados fueron secuenciados, utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 y el "kit" ABI PRISM, que utiliza terminadores marcados y como enzima se utilizó la Amplitaq ADN polimerasa (Perkin Elmer). La secuenciación se realizó con el secuenciador automático ABI 373 ADN sequencer, por el Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia. El proceso anteriormente descrito, se llevó a cabo también con el aislado de *M. nawae* procedente de la República de Corea a fin de proceder a la comparación entre secuencias ya que no existía ninguna accesión disponible de esta especie en la base de datos GenBank.

El mismo proceso se utilizó para identificar molecularmente aislados obtenidos a partir de las estructuras fúngicas formadas en las lesiones en las hojas caídas al suelo así como directamente de estas estructuras tomadas de las lesiones. En este último caso el proceso fue idéntico, con la excepción de la extracción del ADN, que se realizó mediante la técnica de extracción rápida descrita por ALANIZ *et al.* (2009).

Ensayos de patogenicidad

Se seleccionó un aislado representativo de cada especie para los ensayos de patogenicidad (P1 de *Phomopsis*, Pe1 de *Pestalotiopsis*, y M2 de *Mycosphaerella*). Por cada aislado se inocularon 10 plantones sanos de dos años de edad del cv. Rojo Brillante, injertados sobre *D. lotus* y otros 10 plantones injertados sobre *D. virginiana*. El experimento se repitió dos veces.

Para las inoculaciones de *Phomopsis* y *Pestalotiopsis* se prepararon suspensiones de conidios con agua estéril de 5×10^6 conidios ml^{-1} . En el caso de *Phomopsis*, la suspensión se preparó a partir de colonias crecidas en placas con agar agua incubadas en fotoperiodo 12 h a 25 °C durante dos meses y en *Pestalotiopsis* a partir del hongo creciendo en placas con PDA incubadas en oscuridad a 25 °C durante un mes. En el caso de *Mycosphaerella* no se consiguió la esporulación en medio de cultivo, por lo que se preparó una suspensión del micelio triturado del hongo con agua estéril (5×10^5 UFC ml^{-1}) a partir de placas con PDA incubadas en oscuridad a 25 °C durante un mes.

Las suspensiones se pulverizaron sobre los plantones a razón de 200 ml por cada uno. Diez plantones del cv. Rojo Brillante sobre *D. lotus* y otros diez sobre *D. virginiana* se pulverizaron con la misma cantidad de agua estéril utilizándose como testigos en los ensayos. Los plantones se incubaron en una cámara de cultivo cubiertos por un plástico semitransparente para mantener unas condiciones de humedad elevada, en fotoperiodo 12 h a 20 °C durante los primeros 10 días después de la inoculación. Transcurrido este periodo, se hicieron pequeños orificios en el plástico para facilitar la ventilación de los plantones y se incrementó la temperatura de incubación a 22 °C manteniendo las mismas condiciones de iluminación en la cámara de cultivo. El seguimiento de los plantones para observar el momento de aparición y la evolución de los síntomas se realizó semanalmente.

RESULTADOS

Sintomatología

Con el seguimiento de las parcelas afectadas se consiguió la caracterización del síndrome de la nueva enfermedad en caqui. A partir del mes de agosto se observaba la aparición de zonas necróticas redondeadas, de pequeño tamaño, distribuidas al azar por todo el limbo foliar. Estas lesiones no estaban limitadas por las nerviaciones y podían desarrollarse, en un principio, de forma aislada. En una fase más avanzada, estas lesiones se mantenían rodeadas de un pequeño halo de color verde oscuro mientras que el resto del limbo se tornaba clorótico (Figuras 2 y 3). La aparición de estas clorosis iba inmediatamente seguida de defoliación, en muchos casos severa (Figura 4). Estos síntomas iban acompañados de una maduración anticipada y rápida de los frutos, con reblandecimiento acelerado de los tejidos hasta la abscisión (Figura 4). No se detectaban daños directos en frutos, cálices ni pedúnculos. Tampoco se observó en ningún caso lesiones o exudaciones en madera ni lesiones en raíces.

Identificación de especies fúngicas

Se aisló *Phomopsis* en un 84% de las parcelas estudiadas, *Mycosphaerella* en un 74% y *Pestalotiopsis* en un 53% de las mismas. En cinco de las parcelas estudiadas se aisló conjuntamente *Phomopsis* y *Mycosphaerella* y las tres especies se aislaron conjuntamente en siete de las parcelas estudiadas (Cuadro 1).

Se confirmó la identidad de los aislados de *Pestalotiopsis* a partir de la observación de sus conidios característicos en medio de cultivo PDA. A nivel molecular, las secuencias ITS de los aislados se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank mediante el programa BLAST del NCBI (National Center of Biotechnology Information, USA). Los resultados mostraron una semejanza del 100% entre las secuencias de los aislados obteni-



Figura 2. Aspecto de hojas afectadas en campo



Figura 3. Síntomas en hojas y madurez anticipada de los frutos



Figura 4. Defoliación y abscisión masiva de los frutos

dos de la zona de estudio y las accesiones de *P. microspora* de la base de datos.

Se confirmó la identidad de los aislados de *Phomopsis* a partir de la observación de conidios α y β , formados en picnidios en el medio de cultivo tras dos meses de incubación. A nivel molecular, los resultados de las comparaciones entre secuencias mostraron una semejanza del 100% entre los aislados obtenidos de la zona de estudio y las accesiones de *Phomopsis* sp. en la base de datos, no siendo posible encontrar una buena concordancia con ninguna accesión identificada a nivel de especie.

No se observó esporulación en ninguno de los medios de cultivo donde se incubaron los aislados de *Mycosphaerella*. Sin embargo, la morfología de las colonias, que al principio presentaban un color verde oscuro pasando luego a gris oscuro-negro, así como el ratio de crecimiento diario en PDA en oscuridad a 25 °C (0,9-1 mm), coincidía con las características descritas para la especie *M. nawae* (KWON *et al.*, 1995) y era idéntica a la observada en el aislado de origen coreano (Figura 5).

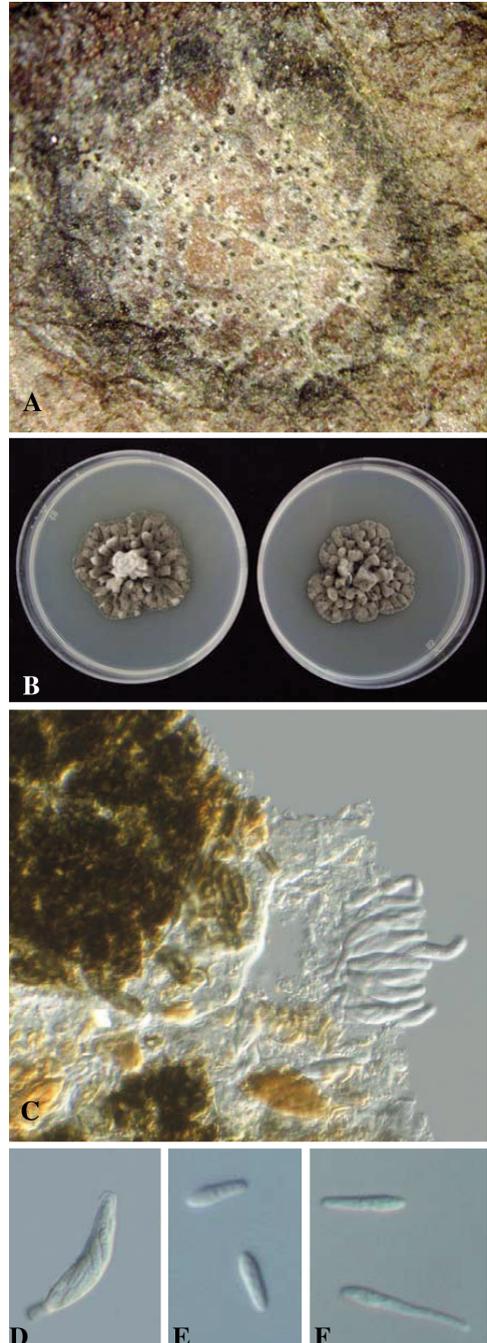


Figura 5. A: Pseudotecios formados en las lesiones de las hojas. B: Aislados de *Mycosphaerella nawae* crecidos en medio de cultivo PDA (izquierda: aislado M2 procedente de Carlet; derecha: aislado de la República de Corea) C: Ascas liberadas a partir de los pseudotecios. D: Asca. E: Ascosporas. F: Ascosporas germinando

Observaciones secuenciales de las lesiones de las hojas caídas que habían permanecido en el suelo de la parcela permitieron observar estructuras de color oscuro (tipo pseudotecio) dentro del tejido foliar (Figura 5). A partir del mes de abril comenzaron a observarse ascas y ascosporas maduras dentro de estos pseudotecios (Figura 5). Las ascas eran en su mayoría cilíndricas con un tamaño de 30,5-60,2 x 8,1-10,5 μm . Las ascosporas eran uniseptadas, generalmente con forma de huso, con unas dimensiones de 10,3 (10-11,5) μm de largo y 3,4 (3-3,9) μm de ancho (Figura 5). La forma y dimensiones de las ascosporas observadas coincidían también con las descritas para la especie *M. nawae* (KWON *et al.*, 1998). Las colonias crecidas en medio PDAS a partir de estos pseudotecios formados en hojas secas caídas al suelo previamente humedecidas y adheridas a las tapas de placas Petri resultaron idénticas a nivel morfológico a las colonias de *Mycosphaerella* obtenidas a partir de los aislamientos de hojas verdes.

A nivel molecular, los resultados de las comparaciones entre secuencias mostraron una semejanza del 96% entre los aislados de *Mycosphaerella* obtenidos de la zona de estudio y las accesiones de *M. stromatosa* J. E. Taylor & Crous en la base de datos. Como se indicó anteriormente, no se encontraron accesiones de *M. nawae* en la base de datos. Sin embargo, al comparar las secuencias del aislado de origen coreano de *M. nawae* y las correspondientes a los aislados de la zona de estudio (incluyendo los obtenidos a partir de aislamientos de las hojas y a partir de los pseudotecios formados en las lesiones de hojas secas caídas al suelo) se obtuvo una concordancia del 100%. Asimismo, resultaron idénticas las secuencias obtenidas a partir de la extracción directa del ADN de los pseudotecios presentes en las lesiones en las hojas caídas al comparárlas con la del aislado de *M. nawae* procedente de la República de Corea. Las secuencias de los aislados M2 y M3 se depositaron en la base de datos GenBank

(Accesiones nº GQ465767 y GQ465768, respectivamente).

Ensayos de patogenicidad

Los síntomas de la enfermedad se reprodujeron únicamente en los plantones inoculados con el aislado de *Mycosphaerella*. Los primeros síntomas (lesiones foliares de color oscuro de pequeño tamaño y aisladas) aparecieron 15 días después de la inoculación. Un mes después de la inoculación, los plantones inoculados mostraron necrosis generalizadas en las hojas, clorosis y defoliación severa mientras que los testigos permanecieron asintomáticos (Figura 6). Se mostraron susceptibles los plantones del cv. Rojo Brillante injertados sobre ambos patrones. De las lesiones se reaisló *Mycosphaerella* completándose así los postulados de Koch.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha identificado al hongo *Mycosphaerella nawae* Hiura & Ikata como agente causal de la enfermedad de la necrosis foliar del caqui en la Comunidad Valenciana. No existen referencias sobre la presencia de este patógeno en plantaciones de caqui en Europa. *M. nawae* se ha descrito como agente causal de la mancha foliar circular del caqui en Japón (ABE *et al.*, 1996) y la República de Corea (KWON *et al.*, 1995; 2004). Asimismo, en el presente estudio, se han caracterizado los síntomas de la enfermedad de la necrosis foliar en España: clorosis, necrosis foliares, defoliación, maduración anticipada y abscisión de los frutos.

De las hojas afectadas se aislaron *Phomopsis* sp., *Pestalotiopsis microspora* y *Mycosphaerella nawae*. *M. nawae* se identificó también a partir de la extracción directa de ADN de los pseudotecios maduros formados en las hojas caídas al suelo así como de las ascosporas liberadas de dichos pseudote-

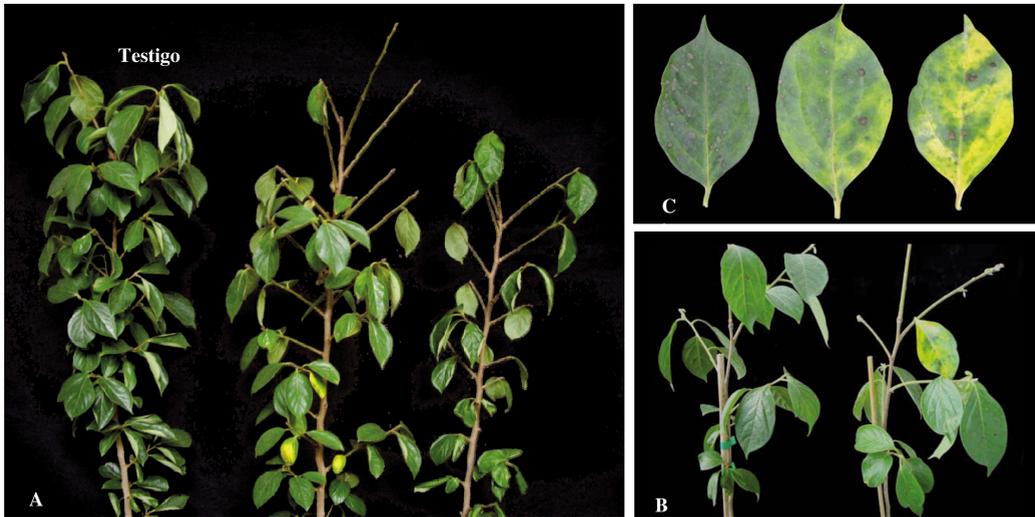


Figura 6. Defoliación, necrosis foliares y clorosis en los plantones de: (A) Rojo Brillante injertado sobre *Diospyros lotus* y (B) Rojo Brillante injertado sobre *D. virginiana*, inoculados con *Mycosphaerella nawae*. C: Detalle de los síntomas observados en las hojas de los plantones inoculados con *M. nawae*

cios. La frecuencia de aislamiento de *M. nawae* de las parcelas prospectadas fue baja, posiblemente debido a la dificultad para el aislamiento del género *Mycosphaerella* y a su lento crecimiento. En la mayoría de las parcelas se aislaron las tres especies conjuntamente o bien *Phomopsis* sp. y *M. nawae*.

La identificación de los hongos que podían estar asociados a la enfermedad se realizó morfológicamente y se utilizaron técnicas moleculares para confirmar su identidad. No fue posible la identificación de los aislados de *Phomopsis* sp. a nivel de especie. En el caso de los aislados de *Pestalotiopsis*, se obtuvo una elevada concordancia al comparar las secuencias obtenidas de la región ITS con las disponibles en la base de datos GenBank correspondientes a *P. microspora*. Esta especie no coincide con las que se han descrito dentro del género *Pestalotiopsis* asociadas con enfermedades foliares del caqui en España y Japón: *P. breviseta*, *P. diospyri*, *P. grandicola*, *P. longiseta* o *P. theae* (TUSET *et al.*, 1999; YASUDA *et al.*, 2003). Sin embargo, KEITH *et al.* (2006) se-

ñalan que es frecuente encontrar *P. microspora* en plantas tropicales y subtropicales como endofito o saprofito oportunista.

La morfología de la colonia y el ratio de crecimiento que presentaban los aislados de *Mycosphaerella* de origen español resultaron similares a los descritos para la especie *M. nawae* (KWON *et al.*, 1995). Se compararon las características morfológicas de estos aislados con un aislado de *M. nawae* procedente de la República de Corea resultando idénticos. Asimismo, la comparación de secuencias de ITS entre los aislados españoles y el aislado de *M. nawae* de origen coreano resultó en un 100% de identidad. Por otra parte, la forma y dimensiones de las ascas y ascosporas liberadas por los pseudotecios formados en las hojas afectadas coincidieron con las descritas para *M. nawae* (KWON *et al.*, 1998).

Los resultados de los ensayos de patogenicidad confirman que el agente causal de los síntomas observados en las plantaciones comerciales de caqui de La Ribera Alta es el hongo *M. nawae*. De las especies utilizadas en los ensayos fue la única con la que se re-

produjeron los síntomas en los plantones de caqui inoculados. Además, fue posible su reasilamiento a partir de las lesiones en los plantones sintomáticos por lo que se completaron los postulados de Koch. Las infecciones severas causadas por *M. nawae* pueden provocar la maduración anticipada y abscisión de los frutos; estos síntomas también se han observado asociados a infecciones causadas por *Pseudocercospora kaki* (DAVID, 2000). Sin embargo, no existen referencias sobre este tipo de síntomas sobre los frutos en plantaciones afectadas por especies fúngicas como *Phomopsis* sp. o *Pestalotiopsis* spp. Los resultados obtenidos podrían sugerir la presencia de estas dos especies como saprofitos oportunistas.

No se observaron daños directos en frutos, cálices o pedúnculos por lo que la maduración anticipada y abscisión de los frutos podría producirse como consecuencia de

una respuesta fisiológica de la planta a las infecciones foliares. Sassa *et al.* (1989, 1990) han identificado diferentes compuestos fitotóxicos producidos por *M. nawae* que podrían estar relacionados con los síntomas observados en los frutos. Serían necesarios futuros estudios para determinar los mecanismos implicados en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad de la necrosis foliar del caqui.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Agroalimed (Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación, Generalitat Valenciana). Los autores agradecen al Dr. Chang-Seuk Park la cesión del aislado de *M. nawae* y a Viveros Hernandorena S.L. los plantones de caqui para realizar el estudio.

ABSTRACT

BERBEGAL, M., A. PÉREZ-SIERRA, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. 2010. Circular Leaf Spot caused by *Mycosphaerella nawae* Hiura & Ikata: a new disease of persimmon in Spain. *Bol. San. Veg. Plagas*, **36**: 213-223.

In August 2008, foliar symptoms never observed before were detected in commercial persimmon (*Diospyros kaki* L. f.) fields located in La Ribera Alta (Valencia province). The objectives of this study were to typify the symptomatology of the disease and determine its causal agent. To this aim, 19 persimmon fields were surveyed in La Ribera Alta. Through these observations the syndrome of the disease was characterized as chlorosis, necrotic spots on the leaves, defoliation, early fruit maturation together with fruit abscission. *Phomopsis* sp., *Pestalotiopsis microspora* and *Mycosphaerella nawae* were consistently isolated from the margin of leaf lesions. Pathogenicity tests demonstrated that *M. nawae* is the causal agent of the new disease in persimmon fields located in la Ribera Alta.

Key words: Rojo Brillante, fruit abscission.

REFERENCIAS

- ABE, Y., ABE, M., HAYASHI, S., OGATA, T. 1996. Occurrence of circular leaf spot caused by *Mycosphaerella nawae* on persimmon in Fukushima Prefecture. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*, 85-87.
- ALANIZ, S., ARMENGOL, J., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ABAD-CAMPOS, P., LEÓN, M. 2009. A multiplex PCR system for the specific detection of *Cylindrocarpum liriodendri*, *C. macrodidymum*, and *C. pauciseptatum* from grapevine. *Plant Disease*, **93**: 821-825.
- ARNAL, L., DEL RÍO, M. A. 2003. Removing astringency by carbon dioxide and nitrogen-enriched atmospheres in persimmon fruit cv. 'Rojo Brillante'. *Food Science*, **68**: 1516-1518.
- BERBEGAL, M., PÉREZ-SIERRA, A., ARMENGOL, J., PARK, C. S., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2010. First report of circular leaf spot of persimmon caused by *Mycosphaerella nawae* in Spain. *Plant Disease*, **94**: 374.
- BLANCO, C., ROMERO, F., DE LOS SANTOS, B. 2008. First report of *Pestalotiopsis diospyri* causing calyx

- blight in Huelva province (Southwestern Spain). *Plant Disease*, **92**: 176.
- CLIMENT, C., LLACER, G. 2001. Caqui. En: Nuez, F. y Llácer, G. (eds). La Horticultura Española, SECH, Ed. de Horticultura, Reus, Tarragona, España.
- DAVID, J. C. 2000. *Pseudocercospora kaki*. IMI Descriptions of fungi and bacteria: 144, sheet 1439. CAB International, Wallingford, UK.
- JAREÑO, C. F. 2009. Avaluació "in vitro" de fungicides per al control de fongs associats a la taca foliar circular del caqui. Trabajo final de carrera. Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología. Valencia.
- KANG, S. W., KWON, J. H., KIM, H. K. 1997. High sporulating medium for *Cercospora kaki* causing persimmon angular leaf spot. *Korean Journal of Plant Pathology*, **13**: 69-71.
- KEITH, L. M., VELASQUEZ, M. E., ZEE, F. T. 2006. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. *Plant Disease*, **90**: 16-23.
- KWON, J. H., PARK, C. S. 2004. Ecology of disease outbreak of circular leaf spot of persimmon and inoculum dynamics of *Mycosphaerella nawae*. *Research in Plant Disease*, **10**: 209-216. (En coreano).
- KWON, J. H., KANG, S. W., CHUNG, B. K., PARK, C. S. 1995. Cultural characteristics of *Mycosphaerella nawae* causing spotted leaf casting of persimmon. *Plant Disease and Agriculture*, **1**: 18-21. (En coreano).
- KWON, J. H., KANG, S. W., PARK, C. S., KIM, H. K. 1998. Microscopic observation of the pseudothecial development of *Mycosphaerella nawae* on persimmon leaves infected by ascospore and conidia. *Korean Journal of Plant Pathology*, **14**: 408-412.
- KWON, J. H., AHN, G. H., PARK, C. S. 2004. Leaf blight of sweet persimmon tree in the field and fruit rot in the storage caused by *Pestalotia diospyri*. *The Korean Journal of Mycology*, **32**: 130-133. (En coreano).
- KWON, J. H., JEONG, S. G., CHUNG, B. K. 2007. Survey of overwintering inoculum potential of anthracnose of sweet persimmon caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Research in Plant Disease*, **13**: 204-206. (En coreano).
- LLACER, G., BADENES, M. L. 2002. Situación actual de la producción de caquis en el mundo. *Agrícola Verge*, **242**: 64-70.
- SALVADOR, A., ARNAL, L., MONTERDE, A., CUQUERELLA, J. 2004. Reduction of chilling injury symptoms in persimmon fruit cv. 'Rojo Brillante' by 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology*, **33**: 285-291.
- SASSA, T., IGARASHI, M. 1990. Structures of (-)-Mycousnine, (+)-Isomycousnine and (+)-Oxymycousnine, new usnic acid derivatives from phytopathogenic *Mycosphaerella nawae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**: 2231-2237.
- SASSA, T., IGARASHI, M., NUKINA, M. 1989. (-)-Mycousnine and (+)-Isomycousnine, new phytotoxic usnic acid derivatives from the phytopathogenic fungus, *Mycosphaerella nawae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**: 1743-1744.
- TUSET, J. J., HINAREJOS, C., MIRA, J. L. 1999. First report of leaf blight on sweet persimmon tree by *Pestalotiopsis theae* in Spain. *Plant Disease*, **83**: 11.
- YASUDA, F., KOBAYASHI, T., WATANABE, H., IZAWA, H. 2003. Addition of *Pestalotiopsis* spp. to leaf spot pathogens of Japanese persimmon. *Journal of General Plant Pathology*, **69**: 29-32.

(Recepción: 12 marzo 2010)

(Aceptación: 7 octubre 2010)

