

Presencia de *Mycosphaerella pinodes* causando enfermedad en cultivos de guisante y tirabeque en la costa de Granada (España)

F. J. CARRETERO, F. DIÁNEZ, M. DE CARA, M. SANTOS, J. C. TELLO

La reiterada presencia en hojas, estípulas, tallos, zarcillos, flores y vainas de manchas necróticas de color marrón, en principio puntiformes y evolucionando a manchas más o menos circulares que evocaban la presencia de una ascochitosis en las plantaciones bajo invernadero de guisantes (*Pisum sativum* var. *vulgare*), y tirabeques (*P. sativum* var. *macrocarpon*) que se cultivan para consumo en fresco, motivaron el estudio taxonómico que se presenta en este artículo. Las dificultades taxonómicas existentes para separar en la ascochitosis del guisante a los tres agentes incitantes que se citan en la literatura, fueron aplicados sobre 21 aislados obtenidos de los cultivos de la costa de Granada.

Los resultados evidencian que 9 de los aislados produjeron las ascas que permitieron asignarlos a *Mycosphaerella pinodes* (anamorfo *Ascochyta pinodes*). Sin embargo los 12 aislados restantes no pudieron ser identificados ni como *Ascochyta pisi* ni como *Ascochyta pinodes* atendiendo para ello a la tabicación y dimensiones de las picnidiosporas, presencia de clamidosporas y formación de cristales de oxalato cálcico. Dichos aislados no tenían las características de *Phoma medicaginis* var. *pinodella* y por ello fueron asignados a *Ascochyta* sp.

F. J. CARRETERO, F. DIÁNEZ, M. DE CARA, M. SANTOS, J. C. TELLO. Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. Cañada de San Urbano. s/n. 04120. Almería (España)

Palabras clave: ascochitosis, *Pisum sativum*.

INTRODUCCIÓN

La producción de guisantes para verdeo en Andalucía fue de 792 ha, y 7.758 t de producción en el año 2004 (JUNTA DE ANDALUCÍA, 2005). Esta superficie está ocupada por el guisante común, *Pisum sativum* LINNEO cuyos cultivares se enmarcan, mayoritariamente, en *P. sativum* L. var. *Vulgare* SCHÜBL et MART (MAROTO, 2002), aunque una proporción pequeña se encuadra dentro de *P. sativum* L. var. *macrocarpon* SER. y *P. sativum* L. var. *sacharum* SER., éstos últimos conocidos vulgarmente como tirabeques o come-todo; denominación motivada por el hecho de ser consumidas tanto

las semillas como las vainas. En la costa de Granada y Almería ha existido una gran tradición en este cultivo para verde, censando la Junta de Andalucía en 2005, una superficie de 296 ha, con una producción total de 2.928 t sin separar guisante de tirabeque.

La "ascochitosis" del guisante es una enfermedad en cuya etiología acoge varias especies de hongos formadoras de picnidios (figuras 1 y 2), cuyas denominaciones antiguas, realizadas a partir de los anamorfos, fueron: *Ascochyta pisi* LIB, *Ascochyta pinodes* JONES, y *Ascochyta pinodella* JONES. La dificultad para diferenciar las tres especies, combinando tamaño de esporas y expresión de síntomas en plantas



Figura 1. Picnidios típicos de *Ascochyta* sp.



Figura 2. Picnidio con cirro de *Ascochyta* sp.

enfermas, se fue resolviendo progresivamente. De esa manera queda *A. pisi*, mientras que *A. pinodes* pasó a denominarse por su teleomorfo como *Mycosphaerella pinodes* (BERK & BLOXAM) VESTERGREN y a *A. pinodella* se le asignó el de *Phoma medicaginis* (MALBR. & ROUM) var. *pinodella* (JONES) BOEREMA en base a la producción de conidios unicelulares (MESSIAEN *et al.*, 1995; TELLO *et al.*, 1988; BRETAG y RAMSEY, 2001)

Las micosis causadas por las tres especies tienen una sintomatología diferente: *A. pisi* produce manchas redondeadas ligeramente hundidas, limitadas por un característico borde hundido y en cuyo centro se forman numerosos picnidios, visibles a simple vista como una punteadura negra. Se presentan las manchas en folíolos, estípulas, vainas y tallos. Rara vez, *A. pisi*, se presenta en la parte baja de la planta. *M. pinodes* y *P. medicaginis* var. *pinodella* pueden, en expresión severa de ambas, no diferenciarse por síntomas. Sin embargo, *M. pinodes*, presenta unos síntomas iniciales consistentes en un moteado oscuro e irregular en hojas, tallos, zarcillos, vainas y estípulas, en la parte baja de la planta. Las manchas, bajo condiciones favorables, se agrandan dando lugar a un característico dibujo en anillos concéntricos, alternando los bordes claros y oscuros de marrón, manchas que en la base del tallo se alargan mostrando tonos azules o rojizos. *P. medica-*

ginis var. *pinodella* no suele tener síntomas aéreos, circunscribiéndose a una podredumbre oscura en el hipocotilo que alcanza a la raíz principal con el consiguiente secado de la planta (MESSIAEN *et al.*, 1995; TELLO *et al.*, 1988; BRETAG y RAMSEY, 2001).

El trabajo que se presenta recoge una investigación sobre la etiología de la ascochitosis observada en los cultivos de guisante y tirabeque bajo invernadero de la costa de Granada, concretamente en el término municipal de Albuñol, durante las campañas 2003-2004 y 2004-2005, donde los síntomas de ascochitosis eran abundantes y llegaban a secar las plantas. Las apreciaciones visuales en el campo permitieron, además, diagnosticar la presencia de mildiu (*Peronospora pisi*) mezclado con las ascochitosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepas estudiadas procedían tanto de hojas (figura 3) como de vainas (figura 4) con semillas contaminadas (figura 5) y de pétalos de flores (figura 6). Los aislamientos a partir del material vegetal enfermo, se hicieron tomando picnidios con una aguja enmangada desinfectada bajo la lupa estereoscópica y sembrando en medio PDA. Un total de 21 aislados fueron utilizados para su identificación.

Los medios de cultivo utilizados fueron: PDA, Agar-guisante, V8 y Agar-cloruro potásico preparados tal como indican TELLO



Figura 3. Sintomatología típica de ascochytosis en hojas.



Figura 4. Sintomatología típica de ascochytosis en vainas.

et al. (1991). Con objeto de forzar la producción de peritecios se usó un medio a base de agar-agua donde se dispusieron hojas sumergidas de guisante que fueron previamente desinfectadas con óxido de propileno como indican para las hojas de clavel TELLO *et al.* (1991). Las incubaciones se hicieron en el ambiente del laboratorio, en cámara bajo luz fluorescente continua y bajo luz ultravioleta.

Los criterios taxonómicos utilizados fueron los indicados por BOEREMA *et al.* (1965), DORENBOSCH (1970), BOEREMA y VERHOEVEN (1979), TELLO *et al.* (1988), HANLIN (1990), MESSIAEN *et al.* (1995) y BRETAG y RAMSEY (2001).



Figura 5. Sintomatología típica de ascochytosis en granos.

Las evaluaciones sobre la septación de los conidios se hicieron a partir de las esporas de un picnidio tomando 10 campos en el microscopio (ocular 10x y objetivo 40x) y computando todos los conidios de cada campo, teñidos con lactofucsina (0.1 g de fucsina en 100 ml de ácido láctico). El dimensionado de conidios (figura 7) y ascosporas se hizo sobre 50 unidades por aislado. Todos los aislados tenían cuando se hicieron las medidas, 30 días de incubación.

Debido a que las cepas perdían con mucha facilidad su capacidad para producir picnidios o peritecios, hubo que regenerarlas. Para ello se utilizaron semillas de guisante, desinfectadas (30 min en lejía comercial de 40 g de Cl activo por litro y posterior aclarado con agua), que se hicieron germinar en PDA sobre el que se repicaban los aislados (figura 8).

Los criterios adoptados para realizar la identificación de los 21 aislados han sido: 1) presencia de peritecios; 2) presencia de clamidosporas; 3) formación de cristales de oxalato en PDA; 4) tabicación de las picnidiosporas; 5) dimensionado de ascas, ascosporas y picnidiosporas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cuadro 1 resume la presencia de peritecios (figura 9) y ascosporas (figura 10), pudiéndose comprobar que de los 21 aisla-

Cuadro 1. Presencia de ascocarpos y ascosporas producidos en medio agar-agua con hojas de guisante

Nº de cepas estudiadas	Código de cepas	
	Presencia de ascocarpos y ascosporas	Ausencia de ascocarpos y ascosporas
21	Asc-1, Asc-3, Asc-4, Asc-9, Asc-11, Asc-12, Asc-13, Asc-19, Asc-20	Asc-2, Asc-5, Asc-6, Asc-7, Asc-B, Asc-10, Asc-14, Asc-15, Asc-16, Asc-17, Asc-18, Asc-21

Cuadro 2: Tabicación de picnidiosporas en 21 cepas de *Ascochyta* aisladas de guisantes y tirabeque. Los datos se han calculado sobre un mínimo de 50 y un máximo de 116 picnidiosporas procedentes de un solo picnidio.

CÓDIGO	Sin tabique	1 tabique	2 tabiques
Asc-1	8,4%	91,6%	0,0%
Asc-2	14,4%	84,0%	1,6%
Asc-3	18,8%	81,2%	0,0%
Asc-4	11,0%	87,3%	1,7%
Asc-5	25,2%	74,8%	0,0%
Asc-6	6,1%	93,9%	0,0%
Asc-7	12,9%	87,1%	0,0%
Asc-8	10,5%	89,5%	0,0%
Asc-9	20,0%	80,0%	0,0%
Asc-10	11,7%	88,3%	0,0%
Asc-11	17,4%	82,6%	0,0%
Asc-12	9,6%	90,4%	0,0%
Asc-13	30,4%	69,6%	0,0%
Asc-14	0,0%	100,0%	0,0%
Asc-15	0,0%	100,0%	0,0%
Asc-16	0,0%	100,0%	0,0%
Asc-17	0,0%	98,0%	2,0%
Asc-18	0,0%	68,0%	32,0%
Asc-19	0,0%	100,0%	0,0%
Asc-20	0,0%	100,0%	0,0%
Asc-21	0,0%	100,0%	0,0%

Cuadro 3. Dimensiones de las picnidiosporas de *Ascochyta pinodes* y *Ascochyta* sp (las medidas se hicieron sobre 50 picnidiosporas procedentes de un picnidio y se expresan con la media seguida de las desviación típica).

Código de aislado	<i>Mycosphaerella pinodes</i>		<i>Ascochyta</i> sp.	
	longitud (µm)	anchura (µm)	longitud (µm)	anchura (µm)
Asc-14			10,95 ± 1,88	3,02 ± 0,81
Asc-15			12,21 ± 2,44	4,38 ± 0,78
Asc-21			14,52 ± 1,45	4,41 ± 0,63
Asc-1	10,61 ± 1,50	3,49 ± 0,80		
Asc-9	11,78 ± 1,24	4,38 ± 0,87		
Asc-19	12,53 ± 0,92	4,89 ± 0,23		
Asc-20	11,81 ± 1,48	4,64 ± 0,68		



Figura 6. Sintomatología típica de ascochitosis en flores

dos estudiados, 9 presentaron el teleomorfo y ello permitiría admitir que dichos aislados podrían ser asignados dentro de la especie *M. pinodes* (anamorfo *A. pinodes*). Las ascas presentaron ocho ascosporas en su interior, monotabicadas, conformadas por dos células iguales, cuyo contorno tiende a ser triangular. Según MESSIAEN *et al* (1995) las dimensiones para las ascas son del orden de 50-80 x 10-15 μm y las ascosporas de 17 x 8 μm . Dos de las cepas (Asc-19 y Asc-20) presentaron ascas con las siguientes dimensiones 57,52 \pm 17,10 x 11,29 \pm 1,94 μm y 53,63 \pm 6,80 x 9,53 \pm 0,93 μm respectivamente. Las ascosporas medían 12,88 \pm 1,93 x 4,92 \pm 0,16 μm . Estas dimensiones podrían considerarse comparables a las proporcionadas por los autores consultados para las ascas pero no para las ascosporas. En cualquier caso, el carácter fundamental para las 9 cepas fue la formación de la forma sexual.

¿Cómo considerar entonces, las 12 cepas que no produjeron la facies ascígena? ¿Pertenecían al anamorfo de *M. pinodes*? ¿Podrían encuadrarse en una de las otras dos especies que conforman el “complejo” de la ascochitosis?.

BOEREMA y BOLLEN (1975) consideran como un carácter fundamental en la taxonomía de *Phoma* y *Ascochyta*, la conidiogénesis. TELLO *et al* (1988) aceptan este criterio como bueno para identificar *P. medicaginis* var. *pinodella* patógeno en plantaciones de

guisante de Murcia. El primer aspecto abordado fue el de la tabicación de las picnidiosporas, cuya evaluación se resume en el cuadro 2. Aunque TELLO *et al*, (1988) encuentran que para 9 cepas aisladas de guisante, dos de ellas no podrían ser asignadas a *Phoma* por la tabicación, en las 7 restantes las picnidiosporas fueron mayoritariamente no tabicadas, asignándolas por tanto a *P. medicaginis* var. *pinodella*. En el cuadro 2 aparecen todas agrupadas como cepas productoras de picnidiosporas monotabicadas y, a veces, bitabicadas, lo cual orientaría la asignación al género *Ascochyta*.

¿Cuál especie: *A. pisi* o *A. pinodes*?

MESSIAEN *et al*. (1995) informaron sobre el tamaño de las picnidiosporas. Así, para *A. pisi* los valores son de 13,9 x 4,2 μm y para *A. pinodes* lo son de 8-16 x 3-6,5 μm . Las dimensiones de varias cepas obtenidas en este estudio se resumen en el cuadro 3.

El cuadro 3 provee de una información interesante, por cuanto permite comparar aislados que produjeron el teleomorfo con aquellos que no lo produjeron. A partir de ellos podría decirse que tienen unas dimensiones bastante parecidas, dimensiones que según se desprende de MESSIAEN *et al*. (1995), podrían estar tanto dentro de los rangos dados tanto para *A. pisi* como para *A. pinodes* y que serían muy superiores a los presentados por TELLO *et al*. (1988) para *P. medicaginis* var. *pinodella*. Por lo tanto, no se podría atribuir con este carácter una asignación



Figura 7. Conidios típicos de *Ascochyta* sp.

nación específica dentro de las dos especies de *Ascochyta* que conforman la micosis observada.

¿Podrían otros caracteres morfológicos servir para separar ambas especies de *Ascochyta*? BOEREMA *et al.* (1965), DORENBOSH (1970) y BOEREMA (1976), consideraban la producción de cristales de oxalato cálcico como un distintivo de *P. medicaginis* var. *pinodella*. PUNITHALINGAM y GIBSON (1976) y TELLO *et al* (1988) consideran que los aislados tienen una versatilidad cierta a la hora de producir los cristales en forma de abanico (figura 11). El otro carácter sería la producción de clamidosporas (figura 12). BRETAG y RAMSEY (2001) mencionan su producción para *A. pinodes* pero no hacen mención de tal carácter para *A. pisi*.

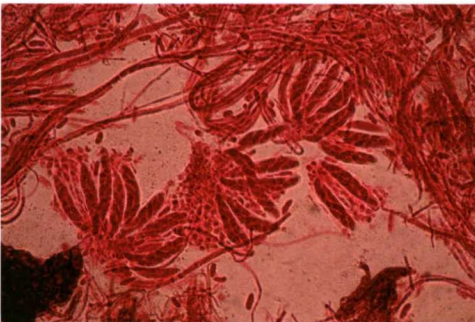


Figura 9. Ascas de *Mycosphaerella pinodes*.

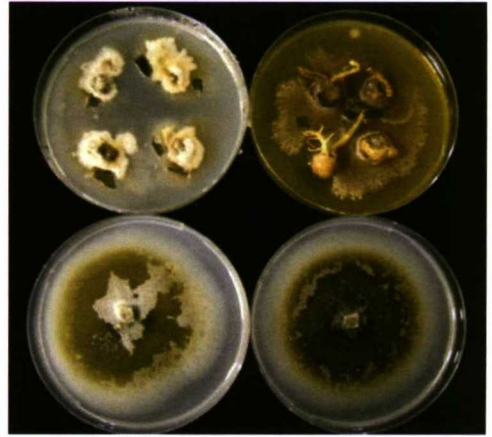


Figura 8. Regeneración en semilla de *Ascochyta* sp. y *Mycosphaerella pinodes* sobre medio de cultivo PDA

El cuadro 4 resume la presencia de clamidosporas y de cristales de oxalato cálcico para las cepas estudiadas. Parece evidente que las clamidosporas no distinguen entre los aislados de *Ascochyta* sp. (cepas Asc-5, Asc-6, Asc-7, Asc-8, Asc-10, Asc-14, Asc-15, Asc-16, Asc-17, Asc-18, Asc-21) y los de *M. pinodes*. Todas las cepas, menos dos, producen clamidosporas lo cual si se admite la sugerencia de BRETAG y RAMSEY (2001), podrían ser asignadas a *A. pinodes*. Sin embargo, los cristales de oxalato cálcico no son producidos por los aislados que produjeron el teleomorfo y desde este punto de vista los aislados designados como *Ascochyta* sp. no podrían encuadrarse

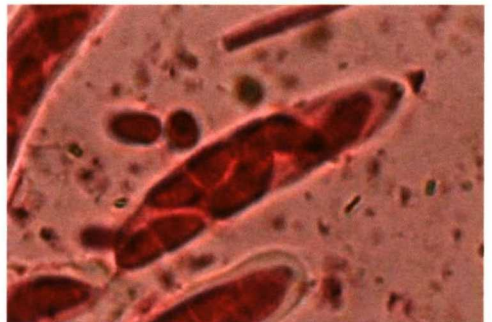


Fig. 10. Detalle de ascosporas de *Mycosphaerella pinodes*.

Cuadro 4. Producción de cristales de oxalato cálcico en abanico y de clamidosporas por aislados de *Ascochyta* en PDA

CÓDIGO	Presencia de clamidosporas	Formación de cristales
Asc-1	SI	No
Asc-2	NO	Si
Asc-3	Abundantes	No
Asc-4	Abundantes	No
Asc-5	Abundantes	No
Asc-6	Abundantes	No
Asc-7	Si	Si
Asc-8	SI	No
Asc-9	Abundantes	No
Asc-10	Abundantes	Si
Asc-11	Si	No
Asc-12	Abundantes	No
Asc-13	NO	No
Asc-14	Abundantes	No
Asc-15	Abundantes	No
Asc-16	Abundantes	No
Asc-17	Abundantes	No
Asc-18	Abundantes	No
Asc-19	Abundantes	No
Asc-20	Abundantes	No
Asc-21	Abundantes	Si

como *A. pinodes*. No obstante, sorprende con respecto a las cepas de *M. pinodes* la formación tan uniforme de cristales de oxalato.

Existe, como consecuencia del planteamiento taxonómico y de la fragmentaria

bibliografía disponible y consultada, una dificultad importante para asignar una u otra especie a 12 aislados de los 21 estudiados. Por el tamaño de las picnidiosporas se aproximan a *A. pinodes* mas que a *A. pisi*, pero



Figura 11. Cristales de oxalato cálcico en forma de abanico.

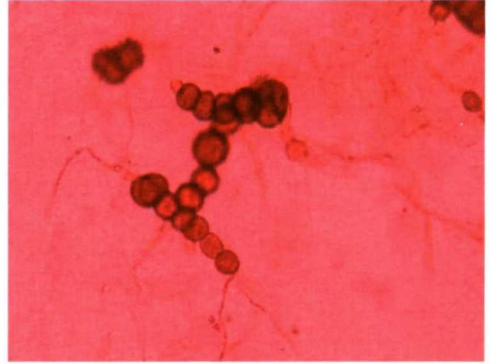
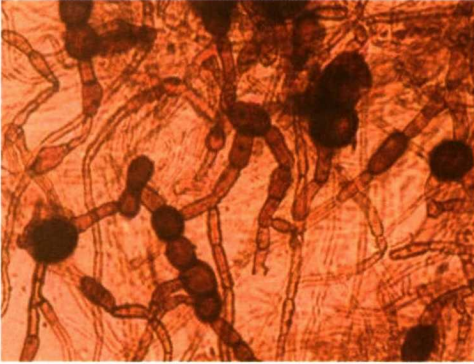


Figura 12. Clamidosporas de *Ascochyta* sp.

este carácter es demasiado débil para utilizarlo como definitivo. Debilidad que se aprecia igualmente para la producción de clamidosporas y cristales de oxalato. Tampoco los síntomas observados en el campo permiten asignarlos a una u otra especie de *Ascochyta*, máxime cuando aparecieron manchas en los pétalos equiparables a las originadas en un principio por *A. pinodes* pero no referidos en la literatura consultada. Por lo tanto, parece prudente denominar a 12 de las 21 cepas

estudiadas como *Ascochyta* sp. Este es uno de los casos de taxonomía clásica de hongos, donde el análisis molecular podría complementar con éxito al examen morfológico y cultural de los especímenes.

Estimamos que es esta la primera vez en España que se presentan datos taxonómicos suficientes como para asegurar que *M. pinodes* (anamorfo: *A. pinodes*) produce enfermedad en guisantes y tirabeques para consumo en fresco y cultivados en invernadero.

ABSTRACT

CARRETERO, F. J., F. DIÁNEZ, M. DE CARA, M. SANTOS, J. C. TELLO. 2008. Presence of *Mycosphaerella pinodes* causing disease on pea and snow pea crops in Granada's coast (Spain). *Bol. San. Veg. Plagas*, **34**: 563-571.

Presence of brown-coloured necrotic spots on leaves, stipulae, stems, tendrils, flowers and pods, firstly punctiform and developing to more or less rounded spots, evoked presence of ascochytirosis on *Pisum sativum* var. *vulgare* and *P. sativum* var. *macrocarpon* greenhouse crops. This fact moved to study the complex taxonomy of 21 isolates that could be collected from affected plants, trying to include them in one of three reported species involved with the disease. Nine isolates developed asci and were assigned to *Mycosphaerella pinodes* (anamorph *Ascochyta pinodes*). However, the 12 other isolates could not be identified as *Ascochyta pisi* or *Ascochyta pinodes*, attending to septation and dimensions of pycnidiospores, presence of chlamydospores and formation of calcium-oxalate crystals. It can be affirmed that those isolates didn't approach to *Phoma medicaginis* var. *pinodella* and they were assigned to *Ascochyta* sp.

Key word: Ascochytirosis, *Pisum sativum*.

REFERENCIAS

- BOEREMA, G. H. 1976. The *Phoma* species studied in culture by Dr. R. W. G. Dennis, Trans Br. Mycol Soc., **67**: 289-319
- BOEREMA, G. H., BOLLEN, G. J. 1975. Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. *Persoonia*, **8**: 111-144
- BOEREMA, G. H., DORENBOSH, M. M. J., LEFFRING, L. 1965. A comparative study of the black stem fungi and red clover and the footrot fungus on pea. *Neth. J. Plant Path.*, **71**: 79-89
- BOEREMA, G. H., VERHOEVEN, A. A. 1979. Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Series 2C: Fungi on field crops: pulse (legumes) and foragecrops (hebeje legumes). *Neth. J. Plant Path.*, **85**, 151-185.
- BRETAG, T. W., RAMSEY, M. 2001. Compendium of Pea Diseases and Pests. Ed. A.P.S. Press. 24-28 pp
- DORENBOSH, M. M. J. 1970. Key to nine ubiquitous soil borne *Phoma*-like fungi. *Persoonia* **6**: 1-14
- HANLIN, R. T. 1990. Illustrated Genera of Ascomycetes. Ed. A.P.S-Press, 263 pp
- JUNTA DE ANDALUCÍA. Consejería de Agricultura y Pesca. <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturay-pesca/publico/>
- MAROTO, J. V. 2002. Horticultura Herbácea Especial. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 702 pp
- MESSIAEN, C. M., BLANCARD, D., ROUXEL, F., LAFON, R. 1995. Enfermedades de las hortalizas. Ed. Mundi.Prensa. Madrid. 575 pp
- PUNITHALINGAM, E., GIBSON, I. A. S. 1976. *Phoma medicaginis* var. *pinodella* C. M. I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, nº 518
- TELLO, J. C., LACASA, A., NAVAS, A. 1988. Prospección de micosis en el cultivo del guisante (*Pisum sativum* L.) en Murcia. Aproximación al conocimiento de los hongos patógenos asociados a las raíces. *Phytoma España* **1**: 46-53.
- TELLO, J. C., VARES, F., LACASA, A. 1991. Análisis de muestras. En: Manual de Laboratorio. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Madrid. 29-77.

(Recepción: 10 abril 2008)

(Aceptación: 20 octubre 2008)