

Resumen

El moteado del níspero, causado por el hongo *Fusicladium eriobotryae*, es la principal enfermedad que afecta a este cultivo en España y otros países de la cuenca Mediterránea. Este hongo ataca brotes jóvenes, hojas y frutos, produciendo manchas circulares de color verde-oliváceo. Los frutos con síntomas de moteado no se pueden comercializar, lo que supone importantes pérdidas económicas. Las especies pertenecientes al género *Fusicladium* son estados anamórficos del género *Venturia*, pero en el caso de *F. eriobotryae*, su fase sexual nunca se ha encontrado. El género *Venturia* incluye importantes patógenos causantes de moteado en otros cultivos, como *V. inaequalis* en manzano, *V. pyrina* en peral ó *F. oleagineum* en olivo.

Aunque en la principal zona de producción de níspero en España su cultivo es una importante fuente de ingresos, hasta la fecha *F. eriobotryae* ha recibido poca atención por parte de investigadores. De hecho, las recomendaciones a los agricultores para el manejo de la enfermedad se han realizado en función de la información existente para el moteado del manzano. En este contexto, los años con condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad dan lugar a importantes pérdidas económicas. Por tanto, se requiere una mejora en el conocimiento del moteado del níspero, que ha sido abordada de forma global en esta tesis, con el objetivo de desarrollar herramientas específicas para el manejo de la enfermedad.

En primer lugar, se estudió el efecto de diversos factores ambientales sobre el crecimiento de *F. eriobotryae*, la germinación de sus conidios y la infección de las hojas de níspero, desarrollando ecuaciones matemáticas capaces de describir estos procesos. El micelio de *F. eriobotryae* fue capaz de crecer y los conidios de germinar en un amplio rango de temperaturas (5-25°C), aunque los mayores porcentajes de germinación y el crecimiento más rápido del micelio ocurrió a temperaturas comprendidas entre 15 y 25°C. Fue necesario un mínimo de 12 horas de humectación para la germinación de un porcentaje apreciable de conidios de *F. eriobotryae* y su viabilidad se vio reducida por la presencia de períodos secos (sin agua libre). La infección de hojas de níspero por *F. eriobotryae* ocurrió entre 10 y 20°C y con, al menos, 12 horas de humectación continua.

Además, se realizó un seguimiento de la dispersión de los conidios de *F. eriobotryae* en dos parcelas de níspero situadas en Callosa d'En Sarrià (Alicante), durante dos ciclos de cultivo. Los conidios de *F. eriobotryae* se capturaron principalmente entre Marzo y Mayo, y el 90% de ellos durante períodos con lluvia. El estudio de la lluvia como predictor de las capturas se realizó mediante análisis de curvas ROC y análisis Bayesianos. Considerando 0,2 mm de lluvia como valor de corte, se obtuvo una alta probabilidad de predecir correctamente la dispersión de los conidios de *F. eriobotryae*. Basándose en el índice de dispersión y la ley de potencia binaria, la incidencia del moteado del níspero se mostró altamente agregada, tanto entre árboles como dentro de ellos, viéndose el grado de agregación influenciado por el valor de la incidencia de la enfermedad. Los resultados obtenidos demuestran que *F. eriobotryae* se dispersa principalmente asociado a las gotas de lluvia.

Estos resultados fueron utilizados para desarrollar un modelo dinámico y mecanicístico, capaz de predecir la infección de frutos de níspero por conidios de *F. eriobotryae*. El modelo simula los períodos de infección del moteado del níspero y su severidad a través de los sub-procesos de dispersión, infección y latencia. Los cambios de un estado a otro dependen de factores ambientales descritos por ecuaciones matemáticas. El modelo fue validado comparándolo con tres grupos diferentes de datos. El modelo predijo de forma precisa la ocurrencia y severidad de los períodos de infección, así como el progreso de la enfermedad en los frutos (con coeficientes de correlación >0.95). Además, los resultados del modelo estuvieron de acuerdo con la valoración que un experto dio de la severidad de la enfermedad durante siete campañas de cultivo.

Como una herramienta complementaria para la evaluación del modelo y también para futuras mediciones de la severidad del moteado del níspero, se desarrolló una escala diagramática de la enfermedad. Este diagrama consistió en 8 imágenes en blanco y negro con los síntomas típicos de la enfermedad sobre los frutos. Además, se comprobó cómo la escala mejora la precisión de las estimaciones hechas por evaluadores no experimentados.

Otra herramienta de utilidad desarrollada en esta tesis ha sido un protocolo de nested-PCR para la identificación de *F. eriobotryae* a partir de cultivos puros del hongo o de tejidos de níspero infectados. Para ello, se diseñó un primer específico en el gen EF1- α que, combinado con el universal EF1-986R, fue capaz de diferenciar *F. eriobotryae* de otros patógenos pertenecientes al género *Venturia* y de otras especies fúngicas habitualmente presentes en tejidos de níspero. Este protocolo puede ser útil para diagnósticos rutinarios, programas de monitoreo de la enfermedad e investigaciones epidemiológicas.

Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar la eficacia de los principales grupos de fungicidas frente a *F. eriobotryae*. Trece fungicidas fueron estudiados *in vitro*, determinando tanto su efecto sobre el crecimiento micelial como en la germinación de los conidios del patógeno. Los resultados mostraron que los fungicidas actualmente recomendados en España por los servicios de sanidad vegetal son capaces de reducir tanto el crecimiento micelial como la germinación de los conidios. Además, se llevó a cabo un experimento en cámara de cultivo para determinar el efecto en pre- y post-infección de cinco materias activas seleccionadas. Las plantas tratadas con difenoconazol o piraclostrobin presentaron valores de severidad relativa al control no inoculado inferiores al 5%, incluso cuando los fungicidas fueron aplicados 7 días antes o después de la inoculación. Sin embargo, boscalida y mancozeb mostraron únicamente buena actividad cuando fueron aplicados antes de la infección.

Finalmente, se determinó la resistencia de *F. eriobotryae* a los fungicidas sistémicos difenoconazol y metil-tiofanato, mediante la inhibición del crecimiento micelial del hongo en medio de cultivo toxicado con cada uno de los fungicidas. Para ello, se recogieron 249 aislados de *F. eriobotryae* en las principales provincias productoras de níspero (Alicante, Almería, Castellón, Granada, y Valencia). Los aislados de *F. eriobotryae* resistentes a difenoconazol se encontraron ampliamente distribuidos, detectándose en 4 de las 5 provincias

muestreadas, mientras que sólo se encontraron aislados resistentes a metil-tiofanato en la provincia de Alicante. En esta provincia, casi el 15% de los aislados fueron resistentes a este fungicida, y también se detectaron aislados con resistencia múltiple a difenoconazol y metil-tiofanato. Los aislados resistentes a metil-tiofanato fueron caracterizados molecularmente mediante la secuenciación del gen de la β -tubulina. Los resultados mostraron que todos los aislados de *F. erobotryae* resistentes al metil-tiofanato contenían una de las sustituciones aminoacídicas E198K, F200Y o L240F.