

## Resum

El motejat de la nespra, causat pel fong *Fusicladium eriobotryae*, és la principal malaltia que afecta aquest cultiu a Espanya i altres països de la conca Mediterrània. Aquest fong ataca brots joves, fulles i fruits, produint taques circulars de color verd-olivaci. Els fruits amb símptomes de motejat no es poden comercialitzar, el que suposa importants pèrdues econòmiques. Les espècies pertanyents al gènere *Fusicladium* són estats anamòrfics del gènere *Venturia*, però en el cas de *F. eriobotryae*, la fase sexual mai s'ha trobat. El gènere *Venturia* inclou importants patògens causants de motejat en altres cultius, com *V. inaequalis* en pomera, *V. pyrina* en perera o *F. oleagineum* en olivera.

Encara que en la zona de producció de nespra a Espanya el seu cultiu és una important font d'ingressos, fins a la data *F. eriobotryae* ha rebut poca atenció per part d'investigadors. De fet, les recomanacions als agricultors per al maneig de la malaltia s'han realitzat en funció de la informació existent per al motejat de la pomera. En aquest context, els anys amb condicions favorables per al desenvolupament de la malaltia donen lloc a importants pèrdues econòmiques. Per tant, es requereix una millora en el coneixement del motejat de la nespra, que ha estat abordada de forma global en aquesta tesi, amb l'objectiu de desenvolupar eines específiques per al maneig de la malaltia.

En primer lloc, es va estudiar l'efecte de diversos factors ambientals sobre el creixement de *F. eriobotryae*, la germinació dels seus conidis i la infecció de les fulles de nespra, desenvolupant equacions matemàtiques capaços de descriure aquests processos. El miceli de *F. eriobotryae* va ser capaç de créixer i els conidis de germinar en un ampli rang de temperatures (5-25 ° C), tot i que els majors percentatges de germinació i el creixement més ràpid del miceli varen ocórrer a temperatures compreses entre 15 i 25 ° C. Va ser necessari un mínim de 12 hores d'humectació per a la germinació d'un percentatge apreciable de conidis de *F. eriobotryae* i la seva viabilitat es va veure reduïda per la presència de períodes secs (sense aigua lliure). La infecció de fulles de nespra per *F. eriobotryae* va ocórrer entre 10 i 20 ° C i amb, almenys, 12 hores d'humectació contínua.

A més, es va realitzar un seguiment de la dispersió dels conidis de *F. eriobotryae* en dues parcel·les de nespra situades a Callosa d'En Sarrià (Alacant), durant dos cicles de cultiu. Els conidis de *F. eriobotryae* es van capturar principalment entre Març i Maig, i el 90% d'ells durant períodes amb pluja. L'estudi de la pluja per a predir les captures es va realitzar mitjançant anàlisi de corbes ROC i anàlisis Bayesians. Considerant 0,2 mm de pluja com a valor de tall, es va obtenir una alta probabilitat de predir correctament la dispersió dels conidis de *F. eriobotryae*. Basant-se en l'índex de dispersió i la llei de potència binària, la incidència del motejat de la nespra es va mostrar altament agregada, tant entre arbres com dins d'ells, trobant-se el grau d'agregació influenciat pel valor de la incidència de la malaltia. Els resultats obtinguts demostren que *F. eriobotryae* es dispersa principalment associat a les gotes de pluja.

Aquests resultats van ser utilitzats per desenvolupar un model dinàmic i mecanicista, capaç de predir la infecció de fruits de nespra per conidis de *F.*

*eriobotryae*. El model simula els períodes d'infecció del motejat de la nespra i la seva severitat a través dels sub-processos de dispersió, infecció i latència. Els canvis d'un estat a un altre depenen de factors ambientals descrits per equacions matemàtiques. El model va ser validat comparant amb tres grups diferents de dades. El model va predir de manera precisa l'ocurrència i severitat dels períodes d'infecció, així com el progrés de la malaltia en els fruits (amb coeficients de correlació  $> 0.95$ ). A més, els resultats del model van estar d'acord amb la valoració que un expert va donar de la severitat de la malaltia durant set campanyes de cultiu.

Com una eina complementària per a l'avaluació del model i també per a futures mesures de la severitat del motejat de la nespra, es va desenvolupar una escala diagramàtica de la malaltia. Aquest diagrama inclou 8 imatges en blanc i negre amb els símptomes típics de la malaltia sobre els fruits. A més, es va comprovar com l'escala millora la precisió de les estimacions fetes per avaluadors no experimentats.

Una altra eina d'utilitat desenvolupada en aquesta tesi ha estat un protocol de nested-PCR per a la identificació de *F. eriobotryae* a partir de cultius purs del fong o de teixits de nespra infectats. Per a això, es va dissenyar un primer específic en el gen EF1- $\alpha$  que, combinat amb l'universal EF1-986R, va ser capaç de diferenciar *F. eriobotryae* d'altres patògens pertanyents al gènere *Venturia* i d'altres espècies fúngiques habitualment presents en teixits de nespra. Aquest protocol pot ser útil per a diagnòstics rutinaris, programes de seguiment de la malaltia i investigacions epidemiològiques.

Un dels objectius d'aquesta tesi va ser avaluar l'eficàcia dels principals grups de fungicides enfront de *F. eriobotryae*. Tretze fungicides van ser estudiats in vitro, determinant tant el seu efecte sobre el creixement micelià com en la germinació dels conidis del patogen. Els resultats van mostrar que els fungicides actualment recomanats a Espanya pels serveis de sanitat vegetal són capaços de reduir tant el creixement micelià com la germinació dels conidis. A més, es va dur a terme un experiment en cambra de cultiu per determinar l'efecte en pre- i post-infecció de cinc matèries actives seleccionades. Les plantes tractades amb difenoconazol o piraclostrobina van presentar valors de severitat relativa al control no inoculat inferiors al 5%, fins i tot quan els fungicides van ser aplicats 7 dies abans o després de la inoculació. No obstant això, boscalid i mancozeb van mostrar únicament bona activitat quan van ser aplicats abans de la infecció.

Finalment, es va determinar la resistència de *F. eriobotryae* als fungicides sistèmics difenoconazol i metil-tiofanato, mitjançant la inhibició del creixement micelià del fong en medi de cultiu toxicat amb cadascun dels fungicides. Per a això, es van recollir 249 aïllats de *F. eriobotryae* a les principals províncies productores de nespra (Alacant, Almeria, Castelló, Granada, i València). Els aïllats de *F. eriobotryae* resistents a difenoconazol es van trobar àmpliament distribuïts, detectant en 4 de les 5 províncies mostrejades, mentre que només es van trobar aïllats resistents a metil-tiofanato a la província d'Alacant. En aquesta província, gairebé el 15% dels aïllats van ser resistents a aquest fungicida, i també es van detectar aïllats amb resistència múltiple a

difenoconazol i metil-tiofanato. Els aïllats resistents a metil-tiofanato van ser caracteritzats molecularment mitjançant la seqüenciació del gen de la  $\beta$ -tubulina. Els resultats van mostrar que tots els aïllats de *F. erobotryae* resistents al metil-tiofanato contenien una de les substitucions aminoacídiques E198K, F200Y o L240F.