

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



*Detección de posibles fuentes de inóculo de *Fusicladium eriobotryae* en níspero*

TRABAJO FIN DE MASTER EN
Ingeniería Agronómica

ALUMNO: D. VÍCTOR SERRA MARTÍNEZ

TUTOR: Dr. JOSEP ARMENGOL FORTÍ
CO-TUTOR: Dra. MÓNICA BERBEGAL MARTÍNEZ

Curso Académico: 2016/2017

VALENCIA, Septiembre del 2017

Tipo Licencia



TÍTULO

DETECCIÓN DE POSIBLES FUENTES DE INÓCULO DE *FUSICLADIUM ERIOBOTRYAE* EN NÍSPERO.

RESUMEN

El moteado causado por *Fusicladium eriobotryae* es la principal enfermedad que afecta al cultivo del níspero. Este hongo, causa manchas en el fruto depreciándolo para su comercialización, pudiendo alcanzar mermas superiores al 50 % de la cosecha. La enfermedad se desarrolla en condiciones de elevada tasa de humectación y una temperatura media de 20 °C y el síntoma más destacable es la presencia de manchas circulares en hojas y frutos. Se sabe que *F. eriobotryae* sobrevive en pequeñas manchas sobre las hojas, pero en la actualidad se desconocen otras posibles fuentes de inóculo. En este trabajo, se estudió el papel de flores, pedúnculos, ramas y frutos momificados como posibles fuentes de inóculo de *F. eriobotryae*. Para ello, se realizaron tres muestreos de material vegetal en tres fechas separadas en el municipio de Callosa d'En Sarrià (Alicante), y posteriormente, se realizaron: i) aislamientos mediante siembra en medio de cultivo PDAS, ii) la visualización al microscopio de esporas de los pellets procedentes de los dos lavados realizados con agua (antes y después del aislamiento) del material vegetal, y iii) se empleó la técnica de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) para la detección y cuantificación molecular de *F. eriobotryae*. Una vez analizadas las muestras: no se logró aislar el hongo en medio de cultivo a partir de tejidos procedentes de flores, pedúnculos, ramas y frutos momificados; no se detectaron esporas de *F. eriobotryae* en los pellets procedentes de los lavados (primero y segundo) de las muestras de los diferentes materiales vegetales estudiados; y, mediante técnicas de qPCR y nested-PCR tampoco se detectó *F. eriobotryae* ni en las porciones de tejido de las muestras vegetales muestreadas ni en los pellets procedentes del primer y segundo lavado. La escasez de lluvia registrada en los últimos años en el municipio de Callosa d'En Sarrià podría relacionarse con la ausencia de infección y presencia del hongo en los tejidos muestreados. Por tanto, para la determinación de las posibles fuentes de inóculo de *F. eriobotryae* en níspero, se necesitará ampliar los trabajos de detección de este hongo patógeno en nuevas campañas de cultivo, en las que las condiciones ambientales sean más favorables para la infección y desarrollo del patógeno en parcelas de níspero.

Palabras clave: *Fusicladium eriobotryae*, enfermedad, hongo, níspero, fuente de inóculo, epidemiología, flores, pedúnculos, ramas, momias.

Alumno: D. Víctor Serra Martínez

Prof. Dr. Josep Armengol Fortí

Dña. Dra. Mónica Berbegal Martínez

Valencia, Septiembre del 2017

TITLE

DETECTION OF POTENTIAL INOCULUM SOURCES OF *FUSICLADIUM ERIBOTRYAE* ON LOQUAT.

ABSTRACT

Loquat scab caused by *Fusicladium eriobotryae* is the main disease affecting loquat cultivation. This fungus causes fruit spots depreciating it for commercialization, being able to cause losses over 50% of the harvest. The disease develops in conditions of high humidity and an average temperature of 20 °C, and the most important symptom is the presence of circular spots on leaves and fruits. It is well known that this fungus survives in small spots on the leaves but, at present, other potential sources of inoculum are unknown. In this work, we studied the role of flowers, peduncles, branches and mummified fruits, as potential sources of *F. eriobotryae* inoculum. To this aim, three surveys of plant material were carried out in the municipality of Callosa d'En Sarrià (Alicante), and subsequently, the following methodologies were applied to the samples: i) isolation using PDAS culture medium, ii) microscopic visualization of spores from the two washes with water of the plant material (before and after isolation), and iii) use the PCR technique or real time PCR (qPCR) for the detection and molecular quantification of *F. eriobotryae*. After the analyses of the samples, it was not possible to isolate the fungus in culture medium from tissues of flowers, peduncles, branches and mummified fruits; no spores of *F. eriobotryae* were detected in the pellets from the washes (first and second) of the samples of the different plant materials studied; and, by means of qPCR and nested-PCR techniques, neither *F. eriobotryae* nor the tissue portions of the sampled plant samples nor the pellets from the first and second wash were detected either. The scarcity of rain recorded in recent years in the municipality of Callosa d'En Sarrià could be related to the absence of infection and the presence of the fungus in the sampled tissues. Therefore, for the determination of the possible sources of inoculum of *F. eriobotryae*, it will be necessary to expand this work in new growing seasons, with more favorable environmental conditions for the infection and the development of the pathogen.

Keywords: *Fusicladium eriobotryae*, disease, fungus, loquat, source of inoculum, epidemiology, flowers, peduncles, branches, mummies.

Student: D. Víctor Serra Martínez

Prof. Dr. Josep Armengol Fortí

Dña. Dra. Mónica Berbegal Martínez

Valencia, September 2017

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a Josep Armengol Fortí, tutor de este trabajo fin de grado, por la oportunidad que me ha brindado para realizar este trabajo con él, por su ayuda, dedicación, y disponibilidad, así como el aprendizaje y motivación recibida, y su pasión hacia la patología vegetal.

En segundo lugar agradecer a Mónica Berbegal Martínez y Georgina Elena Jiménez, co-tutora y colaboradora de este trabajo por la gran ayuda prestada durante su elaboración y también por sus enseñanzas sobre técnicas moleculares.

Agradecer también a Toni y Maela, por la ayuda prestada durante el trabajo en laboratorio.

Agradecer a mis padres por su incondicional apoyo y aprendizaje que han hecho durante todos estos años tanto emocional como moralmente, y por haber hecho posible este sueño.

Y por último, agradecer el apoyo de todos mis amigos, en especial a Pablo Bentancur por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1 El níspero japonés	1
I. 1.1 Origen y difusión	1
I. 1.2 Clasificación botánica y agronómica	2
I. 1.3 Características Agro-Climáticas	4
I. 1.4 Cultivo y prácticas culturales.....	5
I. 1.5 Recolección y comercialización.....	7
I. 2. Importancia del níspero japonés	8
I. 2.1 Importancia del cultivo del níspero japonés en el mundo.....	8
I. 2.2 Importancia y evolución del cultivo del níspero en España.....	9
I. 3. El moteado del níspero.....	10
I. 3.1 Síntomas de la enfermedad	10
I. 3.2 Agente causal.....	11
I. 3.3 Descripción del patógeno.....	11
II. OBJETIVOS	14
III. Detección de posibles fuentes de inóculo de <i>Fusicladium eriobotryae</i> en níspero.	15
III. 1. Materiales y métodos.	15
III. 1.1 Localización y características de las parcelas muestreadas.....	15
III. 1.2 Toma de muestras.....	15
III. 1.3 Análisis de las muestras	17
III. 2.Resultados y discusión	22
III. 2.1 Detección por aislamiento.....	22
III. 2.2 Visualización de esporas de los pellets procedentes de lavados	23
III. 2.3 Detección mediante técnicas moleculares (qPCR).....	24
IV. Conclusiones	29
V. BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ranking de los principales productores de níspero en el mundo (Caballero y Fernández, 2002).....	8
Tabla 2. Fechas de las tomas de muestras y estado fenológico de las parcelas.....	16
Tabla 3. Concentración y volumen de los componentes de la mezcla madre de qPCR.....	21
Tabla 4. Condiciones de reacción para qPCR.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 5. Condiciones de reacción para PCR.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de Níspero con frutos	3
Figura 2. Campos de níspero cubiertos con malla y sin cubrir	4
Figura 3. Operarios de la cooperativa de Callosa d’En Sarrià envasando nísperos en cajas para la venta en fresco.....	8
Figura 4. Evolución de la superficie total cultivada de níspero en España en hectáreas (MAPAMA, 2015).	9
Figura 5. Evolución de la producción de níspero en España expresado en toneladas (MAPAMA, 2015).	9
Figura 6. Síntomas de <i>Fusicladium eriobotryae</i> en una hoja de níspero	10
Figura 7. Síntomas de <i>Fusicladium eriobotryae</i> en frutos de níspero.....	11
Figura 8. Conidiogénesis de <i>Fusicladium eriobotryae</i>	11
Figura 9. Crecimiento de cultivo de <i>Fusicladium eriobotryae</i> en placa Petri a 20 °C.	12
Figura 10. Ciclo patológico del moteado del níspero causado por <i>F. eriobotryae</i> (González-Dominguez <i>et al.</i> , 2014a).	13
Figura 11. Imagen de satélite de las parcelas de estudio en Callosa d’En Sarrià (SigPac).	15
Figura 12. Parcela con cultivo de níspero sin cubrir (izquierda) y parcela de cultivo de níspero con malla (derecha).	16
Figura 13. Esquema de la localización de los cebadores específicos empleados en el trabajo FUG2F-FUG2R (datos no publicados) y los cebadores que amplifican una secuencia parcial (1250 pb) del gen gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PD) (Sánchez-Torres <i>et al.</i> , 2009).	20
Figura 14. Recta de calibrado en la que se representa la concentración de ADN (fg/μl) frente al valor de Ct.	24
Figura 15. Riesgo de infección diario por <i>Fusicladium eriobotryae</i> en la localidad de Callosa d’En Sarrià indicado por programa “EriScab” en el periodo del 1 de octubre al 31 de marzo, de la campaña 2013-2014.	26
Figura 16. Riesgo de infección diario por <i>Fusicladium eriobotryae</i> en la localidad de Callosa d’En Sarrià indicado por programa “EriScab” en el periodo del 1 de octubre al 31 de marzo, de la campaña 2014-2015.	27
Figura 17. Riesgo de infección diario por <i>Fusicladium eriobotryae</i> en la localidad de Callosa d’En Sarrià indicado por programa “EriScab” en el periodo del 1 de octubre al 31 de marzo, de la campaña 2015-2016.	27

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I. 1 El níspero japonés

I. 1.1 Origen y difusión

La primera mención del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl) data de un libro chino en el año 506, cuyo origen lo sitúa en el sur de China, en el valle del río Daduhe, dentro de uno de los ocho centros genéticos descritos por el ruso botánico Vavilov. Esto se contradice con la descripción de Lindley, quien lo consideró originario del Japón, hasta el punto de asignarle el epíteto *japonica* a la especie (Rodríguez, 1983; Calabrese, 2006; Reig, 2010).

La primera descripción del níspero en Japón data del año 1180, pero los frutos que proporcionaban los nísperos eran pequeños y de forma redondeada, por lo que no se cultivaban en plan de aprovechamiento como árbol frutal, sino como ornamental, al igual que en China e India. Pero no fue hasta 1830 y 1847 cuando, a partir de nuevas introducciones sucesivas desde China al puerto de Nagasaki (Japón), que no comenzó a manifestarse interés en el cultivo de este frutal. La historia del cultivo del níspero en Japón se inició con la plantación de semillas de la variedad Toubiwa en la isla de Mogi, que dio nombre a la variedad del mismo nombre. A partir de ésta surgió en 1875 la variedad Tanaka, la cual en nuestros días, por expansión geográfica, es la más difundida del mundo (Rodríguez, 1983; Calabrese, 2006).

La expansión del cultivo a otros países asiáticos y a occidente fue lenta, principalmente debido a la prohibición de naves extranjeras en las aguas del archipiélago de Japón, por lo que el comercio con Japón era difícil y esporádico. Este aislamiento duró hasta el final del 1854, durante este aislamiento político el único puerto que permaneció libre fue el de Nagasaki (Calabrese, 2006).

Parece ser que los jesuitas llevaron el níspero del Japón a la isla de Mauricio, pasando de aquí en 1784 a Francia, al jardín de las plantas de París, y de este al Jardín Botánico de Nápoles. A partir de aquí se extendió por toda la cuenca Mediterránea, donde el cultivo se ha adaptado favorablemente, especialmente en las zonas templadas de Italia, Turquía, Grecia, Líbano, Argelia, Marruecos y todo el norte de África. En España fue introducido por marinos mercantes hace más de 200 años, y de aquí se extendió por todo el Levante y Sudeste de la Península Ibérica. En América del Norte se adaptó y se cultivó durante mucho tiempo en California, en Florida, y luego se extendió el cultivo por América Central y casi toda América del Sur (Rodríguez, 1983).

I. 1.2 Clasificación botánica y agronómica

El níspero japonés, *E. japonica*, pertenece al orden *Rosales*, de la familia *Rosaceae* y subfamilia *Pomoideae* (Agustí, 2010).

Se trata de un árbol vigoroso (Figura 1), llegando a alcanzar en las mejores condiciones de cultivo hasta 8 metros, pero normalmente no supera la media de 5 a 6 metros, la forma de la copa es esférica y en algunas variedades de forma piramidal. La entrada de producción es rápida, siendo de (2-3 años), con tendencia a la verticalidad y productivo (Rodríguez, 1983; Agustí, 2010).

En los primeros cuatro o cinco años la raíz es pivotante, con gran poder de penetración en terrenos sueltos y de regadío llegando a alcanzar una profundidad máxima de 2,5 m, pero después poco a poco crecen y se extienden raíces secundarias poco profundidad creando un sistema radical superficial.

Posee un tronco derecho, que en algunas plantaciones llega a alcanzar una altura media de 0,75-1,25m, presenta una corteza rugosa con descamado anual y de color gris pardo. Las ramas principales son gruesas y cortas, con entrenudos un poco largos. Las ramas nuevas brotan de las yemas laterales y de la terminal; de éstas brotarán los ramos de fructificación. Las ramas secundarias son muy finas y largas, de donde brotarán las yemas de madera (Rodríguez, 1983).

Sus hojas son perennes, grandes, duras y de bordes aserrados, de forma oblongo-lanceolada, y su longitud varía según la variedad entre 18-45 cm.

En condiciones mediterráneas el níspero florece en otoño. La inflorescencia del níspero japonés es una panícula de entre 18 y 40 cm de longitud y forma piramidal. Ésta consta de un eje principal en se insertan de 5 a 10 brazos consistentes no leñosos, que contienen un número variable de flores agrupadas en racimos, normalmente entre 60 y 70 flores por panícula.

Sus flores son hermafroditas, olorosas, pequeñas, de pétalos blancos y cáliz marrón, y pubescente. El cáliz es persistente y está formado por cinco sépalos soldados de color verde-marrón; la corola está formada por cinco pétalos libres de color blanco; posee 20-40 estambres libres y entre 2 y 5 estigmas y estilos que se unen basalmente a un ovario ínfero con 5 carpelos, cada uno de los cuales puede albergar 2 óvulos.

El futo es un pomo de forma normalmente oval o piriforme, alcanzando en los mejores cultivares una longitud de 7 cm, el color de la piel varia del amarillo pálido al anaranjado y la pulpa del blanco al naranja según la variedad. El cambio de color avanza desde la zona estilar a la peduncular. La piel es dura y fina, y está cubierta por un vello gris que, al madurar forma una pubescencia blanca. No se desprende del árbol.

El fruto alberga entre 1-5 semillas grandes, brillantes de color marrón, aunque puede albergar hasta 10 (Agustí y Reig, 2006).



Figura 1. Árbol de Níspero con frutos

Las principales variedades cultivadas de níspero japonés en España son:

-Algerie. Constituye la variedad más importante en España, con cerca del 70 % de la superficie destinada a este cultivo. Árbol de vigor medio, con tendencia a la verticalidad y productivo. Frutos de tamaño medio a grande, de forma ovalada y cavidad calicina semiprofunda. Piel áspera y fácil de separar. Pulpa de color amarillo-crema, firme, jugosa y de sabor muy agradable. Soporta bien el transporte y su conservación a baja temperatura, pero es muy sensible a la mancha purpura. Madura a finales de abril (Agustí, 2010).

-Golden nugget. Variedad extensamente cultivada en América. Árbol de vigor medio y productivo. Fruto de tamaño grande, redondo y calicina poca profunda. Piel fuerte y dura, pero se desprende bien. Pulpa firme, jugosa y sabor aciculado. Es más resistente a la mancha purpura que el 'Algerie'. Resistencia media a la manipulación y al transporte. Madura a principios de mayo.

-Tanaka. Cultivada en Japón, en España apenas representa el 15 % de la superficie total. Árbol vigoroso, con tendencia a la verticalidad y ramas, a veces desnudas, productivo. Fruto de tamaño grande, forma piriforme y cavidad calicina poca profunda. Piel fina, vellosa y dura, que se separa fácilmente. Pulpa de color amarillo, dura, jugosa, dulce y, al mismo tiempo, de sabor fuertemente acidulado. Buena resistencia a la manipulación y transporte y buena conservación en frío. Muy sensible a la mancha púrpura. Madura la segunda quincena de mayo (Agustí, 2010).

Otras variedades importantes: 'Cardona', 'Peluches' y 'Magdal' en España; Moggi en Japón; 'Early red' y 'Champagne' en California; 'Olivier' y 'Fletcher' en Florida; 'Vaniglia' y 'Sanfilippara' en Italia; 'Precoce de Itaquera' y 'Mizuho' en Brasil (Agustí, 2010).

I. 1.3 Características Agro-Climáticas

I. 1.3.1 Clima

El níspero es un frutal de clima subtropical o templado cálido con inviernos suaves, ya que es en esta época del año cuando florece y se desarrolla el fruto. En zonas de clima muy frío o excesivamente cálido y húmedo crece como planta ornamental, pero no es factible alcanzar una producción comercial aceptable.

La planta tolera temperaturas de -10°C , pero los frutos se dañan a -3°C ; la temperatura letal para las yemas florales es de $-7,2^{\circ}\text{C}$ y para las flores abiertas de $-3,3^{\circ}\text{C}$. El daño por frío provocado en panículas a -2°C el daño es del 10 %, del 40-49 % a -3°C y del 100 % a -4°C , siendo el momento más sensible cuando los frutos tienen alrededor de 5 mm.

Las temperaturas extremas estivales también son perjudiciales para el cultivo. La tasa fotosintética aumenta entre los 15 y los 30°C , disminuyendo marcadamente por encima de los 35°C .

Los vientos secos y cálidos producen el acorchamiento de las hojas y el rameado del fruto, dañándolo. Las altas temperaturas y las radiaciones solares intensas también pueden dañar el fruto (Gariglio *et al.*, 2002). Para la protección contra el viento en los últimos años es común encontrarse el forzado del cultivo bajo malla plástica (Figura 2), en general suelen retrasar la cosecha en 4 días, pero en algunos cultivares como el “Algerie” la adelantan 10-12 días debido al incremento de temperatura interior (Gariglio, 2006).



Figura 2. Campos de níspero cubiertos con malla y sin cubrir

I. 1.3.2 Suelo

El níspero se adapta bien a una amplia variedad de suelos de moderada fertilidad, desde arenosos a arcillosos, siempre que presenten un buen drenaje. El pH óptimo se sitúa entre 6 y 8, y no tolera bien los suelos ácidos. Se le encuentra casi siempre en suelos francos, con frecuencia ligeramente calizos y pedregosos. En suelos arenosos, con poca capacidad de retención de agua

y de bajo calor específico, el fruto es de pequeño tamaño, rico en azúcares y de maduración precoz. En suelos arcillosos el fruto es de mayor tamaño pero menos sabroso y de maduración más tardía.

Su resistencia a la salinidad es baja, pero existen patrones que mejoran este comportamiento (Gariglio *et al.*, 2002).

I. 1.3.3 Agua

Con pluviometrías anuales inferiores a 1200-2000 mm es necesario recurrir al riego para obtener cosechas abundantes y de calidad.

La falta de agua durante el periodo de desarrollo vegetativo (junio-agosto) reduce la brotación. En estas condiciones, las lluvias otoñales pueden originar floraciones prematuras, expuestas, en muchas zonas de cultivo, a heladas. Y en época de desarrollo del fruto la falta de agua reduce su tamaño final.

Por el contrario, lluvias abundante en etapas próximas a la maduración del fruto reducen la calidad organoléptica de los mismo y provocan, en muchos casos, el cracking o rajado de frutos (Gariglio *et al.*, 2002).

I. 1.4 Cultivo y prácticas culturales

I. 1.4.1 Propagación

Antiguamente el níspero, por ser en su mayoría una especie autógama, se propagaba por semillas, pero actualmente para perpetuar una variedad se recurre al injerto (Rodríguez, 1983). Por otra parte, la capacidad de fructificación de plantas obtenidas a partir de semillas es casi siempre menor a la de su planta madre, además de retrasar la entrada de producción (Cautín *et al.*, 2006).

Es por esto, que hoy en día se utiliza el injerto de una variedad sobre un patrón, generalmente franco. Este método permite la producción de frutos en un periodo de 2 a 3 años (Cautín *et al.*, 2006).

I. 1.4.2 Plantación

El marco de plantación depende de la variedad, clima y sistema de cultivo; lo más usuales son los 5 x 5 m y 6 x 5 m (Rodríguez, 1983). En las plantaciones de alta densidad y marco rectangular se consideran distanciamientos de 4 a 5 m entre líneas y 2,5 a 3 m dentro de la línea, resultando densidad que fluctúan entre 1000 y 666 plantas hectárea. En cambio, en plantaciones de baja densidad se suele utilizar un marco real de 6 x 6 m, con la posibilidad de iniciar la plantación con mayor densidad con el sistema de quince o cinco deoros (Cautín *et al.*, 2006).

En el cultivo del níspero es necesario diseñar plantaciones de media a alta densidad, esto es, de 600 a 1000 árboles por hectárea, si con ello se quiere lograr el punto de equilibrio entre el vegetativo y reproductivo lo antes posible. El problema con estas plantaciones es que si no se lleva a cabo una adecuada labor de formación de los árboles, en pocos años se generan problemas de emboscamiento.

Por otro lado, en plantaciones de baja densidad, menos de 300 plantas por hectárea, con árboles de gran tamaño. Los árboles se presentan vacíos y con ramas exageradamente largas, con lo que conlleva una menor capacidad de abastecimiento de agua y nutrientes a los frutos (Cautín *et al.*, 2006).

I. 1.4.3 Poda

La tendencia natural de estos árboles es a crecer verticalmente, con gran desarrollo y copa en forma globosa. De acuerdo con ello, se acostumbra a realizar una poda de formación en vaso, con cuatro brazos principales. Otras formas, de eje central con formación de pisos, variables en número según la tendencia a la verticalidad de la variedad, pueden resultar más aconsejables en el reparto de la cosecha y la calidad del fruto, pero no se emplean en la práctica. La poda de fructificación se limita a eliminar, tras la recolección, el eje de las inflorescencias que han aportado la cosecha y alguna rama seca o mal situada (Agustí, 2010).

Con la poda, se aportan distintos beneficios como: la regularización de la producción; obtención de frutos de mejor calidad; mantenimiento de un equilibrio entre las ramas de fruto y las ramas de madera; eliminación de las ramas secas y enfermas; mantenimiento de un equilibrio entre la parte aérea y subterránea; y favorecer las labores de cultivo que se puedan efectuar (Rodríguez, 1983).

I. 1.4.4 Aclareo de frutos

Se entiende por aclareo de frutos la eliminación de un número de ellos por árbol con el fin de que los que permanecen alcancen un tamaño mayor (Cautín *et al.*, 2006).

El aclareo manual en el níspero japonés puede llevarse a cabo directamente sobre la panícula en flor, esto es, cortando su eje central y eliminando, aproximadamente, la mitad de sus flores, o eliminando selectivamente los frutos recién cuajados, cuando estos tienen un diámetro de 1-1.5 cm.

El aclareo sobre la panícula presenta un ahorro de mano de obra pero tiene el inconveniente que la estructura queda muy expuesta a las inclemencias meteorológicas (Cautín *et al.*, 2006).

El aclareo químico es posible con la aplicación de ANA, a una concentración de 20 mg/l, cuando son visibles 2-3 frutos cuajados por panícula; esta técnica debe complementarse

con un repaso manual, pero reduce en más de un 50% los costes de mano de obra del aclareo (Agustí, 2010).

1.4.5 Estimulo del desarrollo del fruto

Para el incremento y desarrollo final del fruto se pueden aplicar dos técnicas complementarias y específicas: el rayado de ramas y la aplicación de auxinas de síntesis.

El rayado se efectúa sobre las ramas secundarias de los arboles adultos y utilizando una tijeras, de filos curvos, diseñados al efecto. El corte (rayado) o eliminación de un anillo (≈ 1 cm) de la corteza (anillado) interrumpe el transporte floemático y mejora la disponibilidad de carbohidratos por parte de los órganos que se desarrollan por la zona superior del rayado. Los mejores resultados se obtienen cuando el fruto alcanza un diámetro de 22-24 cm, esto es, en los estados 702-704 de la escala fenológica BBCH (Cautín *et al.*, 2006).

Otra forma de estimular el crecimiento del fruto es mediante la aplicación de auxinas de síntesis, entre las que destaca éster butilglicólico del ácido 2,4-diclorofenoxiprónico (2,4-DP). La mejor época de tratamiento se establece cuando el fruto ha alcanzado 12-15 mm de diámetros (estados 703-705 de la escala fenológica BBCH). Para estas condiciones el diámetro final del fruto aumenta en un 10 % (3 mm por fruto), aproximadamente. Tratamientos anteriores o posteriores apenas presentan respuesta (Cautín *et al.*, 2006).

I. 1.5 Recolección y comercialización

La recolección del níspero es manual y muy delicada, de ahí que una de las primeras cosas a tener en cuenta en la actualidad es formar los arboles bajos, de manera que los frutos estén al alcance de la mano de los recolectores, desde el suelo.

El uso de escaleras o taburetes para esta faena hace aumentar los gastos de recolección un 30%, e incluso obliga al abandono de una parte de la cosecha que, por estar distante, es difícil de coger (Rodríguez, 1983).

El fruto, en el momento de la recolección, ha de presentar un desarrollo y grado de madurez tal que le permita soportar la manipulación, transporte, acondicionamiento y exigencias comerciales establecidas para los mismos (diámetro, firmeza, porcentaje de acidez y grados brix) (Cautín *et al.*, 2006).

La época de recolección, para las condiciones climáticas mediterráneas, tiene lugar en la primavera, durante los meses de abril y mayo, pero depende de varios factores, entre que los destacan: el tipo de variedad, el clima del lugar, el lugar, la situación y orientación, el suelo, la altitud, y, el vigor y la fertilización.

La mayor parte de la producción de nísperos se comercializa para consumo en fresco (Figura 3), aunque los frutos también se consumen en almíbar, mermeladas y zumos. La miel uniflora del níspero es muy apreciada en las zonas de cultivo (Cautín *et al.*, 2006).



Figura 3. Operarios de la cooperativa de Callosa d'En Sarrià envasando nísperos en cajas para la venta en fresco.

I. 2. Importancia del níspero japonés

I. 2.1 Importancia del cultivo del níspero japonés en el mundo

Según el estudio realizado por Caballero y Fernández en el año 2002 el primer productor del mundo de nísperos es China con 200.000 t, en segundo lugar se encuentra España con una producción de 41.487 t, seguido por Pakistán, Turquía y Japón. En la Tabla 1 se muestra el Ranking de países productores del mundo.

En cambio, el país con una mayor exportación es España con 19.400 t, seguido de China con 2.000 t y Pakistán con 1.600 t (Caballero y Fernández, 2002).

Tabla 1. Ranking de los principales productores de níspero en el mundo (Caballero y Fernández, 2002).

País	Superficie (ha)	Producción (t)	Exportación (t)
China	42.000	200.000	2.000
Japón	2.420	10.245	
Pakistan	10.000 (var.local)	12.800	
	1.000 (Tanaka)	16.000	1.600
Israel	330	3.000	
Egipto	33	440	
Grecia	300	2.750	
Marruecos	385	6.400	
Portugal	243	950	
Italia	663	4.412	
Turquia	1.470	13.500	147
Chile	138		37
Brasil	300	2.400	
España	2.914	41.487	19.400
Total	62.196	314.384	23.184

I. 2.2 Importancia y evolución del cultivo del níspero en España

En España, según el anuario de estadística del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente del 2015 el cultivo del níspero ocupa una superficie total de 2.579 hectáreas de las cuales, 98 están en secano y 2.481 en regadío.

El rendimiento del cultivo del níspero en España es de 1.279 kg/ha en secano y 11.806 kg/ha en regadío. La producción total es de 28.449 t, esto engloba las plantaciones regulares como los arboles diseminados, y el valor de la producción alcanza los 34.281 (expresado en miles de euros) (MAPAMA, 2015)

Las Comunidades Autónomas más importantes en el cultivo del níspero son la Comunidad Valenciana, alcanzando más de la mitad de la producción nacional con unas 15.969 t, y Andalucía con casi 11.997 t (MAPAMA 2015).

La evolución de la superficie total en diez años ha sufrido una leve disminución, que va de 3.009 hectáreas en el año 2004 a 2.579 hectáreas en el año 2014, este descenso se aprecia en la Figura 4.

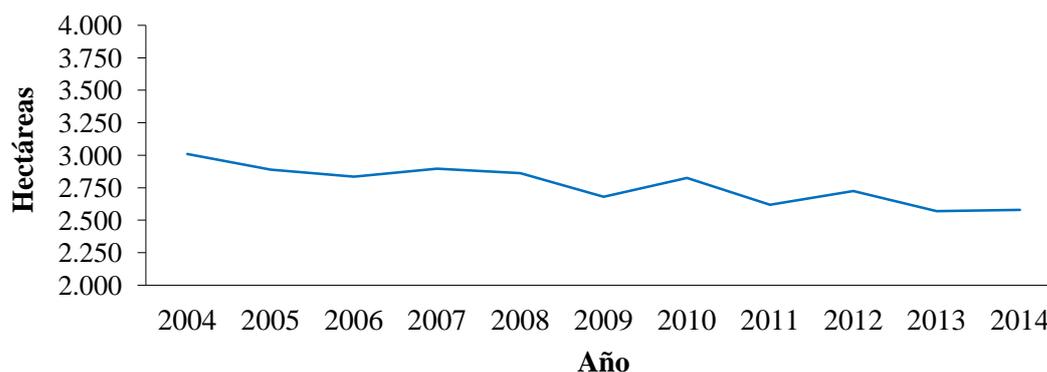


Figura 4. Evolución de la superficie total cultivada de níspero en España en hectáreas (MAPAMA, 2015).

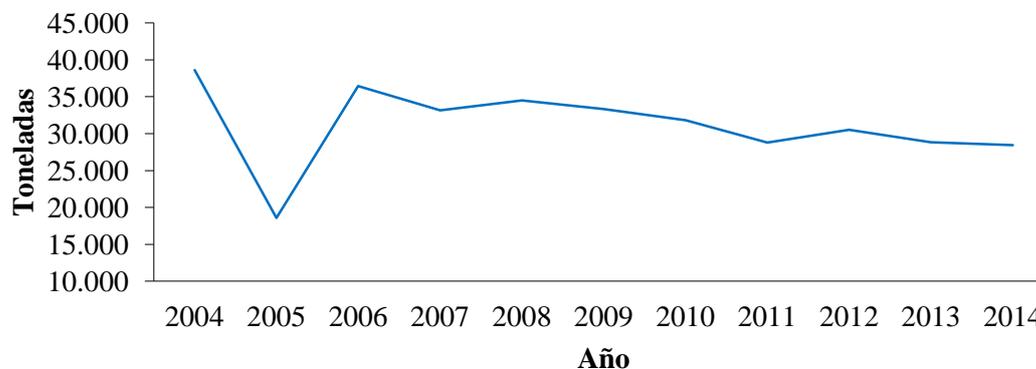


Figura 5. Evolución de la producción de níspero en España expresado en toneladas (MAPAMA, 2015).

Por lo que se refiere a la producción de níspero en el periodo comprendido entre los años 2004 a 2014, ésta ha disminuido de 38.604 toneladas a 28.449 de toneladas. En la Figura 5 se puede apreciar esta evolución.

I. 3. El moteado del níspero

Entre las enfermedades que atacan el níspero cabe destacar el “el moteado o roña”. Esta enfermedad es especialmente importante en la parte occidental de la cuenca mediterránea, donde produce numerosos daños, pudiendo afectar en algunos casos más de un 50% de la cosecha (Sánchez-Torres *et al.*, 2009). El porcentaje de daños está fuertemente condicionado por la climatología de la primavera y sobre todo de las lluvias (MAPAMA, 2014).

I. 3.1 Síntomas de la enfermedad

Esta enfermedad puede infectar hojas, brotes y frutos, sobre todo en etapas tempranas de su desarrollo (González-Domínguez *et al.*, 2013).

En las hojas del níspero, el hongo produce unas manchas pardo-verduzcas, que se vuelven amarillentas y, más tarde, de color marrón oscuro (Figura 6). Al principio las manchas son pequeños círculos de medio centímetro de diámetro, pero poco a poco van extendiéndose hasta unirse unas con otras, dañando una gran parte de la hoja que adquiere un color pálido y se encorva (Gisbert *et al.*, 2006).



Figura 6. Síntomas de *Fusicladium eriobotryae* en una hoja de níspero

Los síntomas más apreciables se producen en el fruto, siendo visibles manchas verdes oscuras a marrón, que pueden aumentar de tamaño hasta cubrir toda su superficie (Figura 7). Los frutos afectados son inadecuados para el mercado, lo que resulta en pérdidas económicas significativas (González-Domínguez *et al.*, 2013).



Figura 7. Síntomas de *Fusicladium eriobotryae* en frutos de níspero.

I. 3.2 Agente causal

El moteado del níspero está causado por el hongo anamórfico *Fusicladium eriobotryae* (Cavara) Sacc. (Gisbert *et al.*, 2006). Desde hace años la mayoría de las citas antiguas se refieren a él como agente causal del moteado en piracanta y manzano. No obstante, recientemente, Sánchez-Torres *et al.* (2007a y 2009) estudiaron la etiología del moteado del níspero, determinando que *F. eriobotryae* es el agente causal de esta enfermedad.

I. 3.3 Descripción del patógeno

I. 3.3.1 Morfología

Los conidios de *F. eriobotryae* tienen forma variable, desde típicamente ovoides a obpiriformes, son solitarios, rectos y pueden presentar en algunos casos un septo. Su tamaño oscila entre $11,63 \pm 2,52 \times 6,30 \pm 0,58 \mu\text{m}$ en etapas jóvenes y $11,63 \pm 2,52 \times 6,30 \pm 0,37 \mu\text{m}$ en etapas adultas. Además se caracterizan por presentar un estrechamiento en la punta y aspecto redondeado en la zona del ápice.

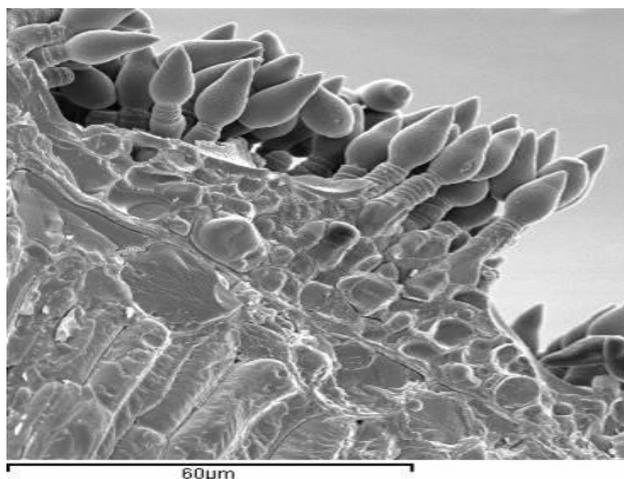


Figura 8. Conidiogénesis de *Fusicladium eriobotryae*

La conidiogénesis (Figura 8) más frecuente corresponde a una de tipo percurrente si bien también puede observarse en algunos casos proliferación de tipo simpodial. El conidióforo

presenta un tamaño que oscila entre $9,59 \pm 2,02 \times 4,57 \pm 0,52 \mu\text{m}$ (adulto). La conidiogénesis percurrente puede ser en algunos casos muy manifiesta, apreciándose claramente las cicatrices de los conidios ya formados y liberados (Sánchez-Torres *et al.*, 2007b).

I. 3.3.2 Germinación y crecimiento

Fusicladium eriobotryae es capaz de crecer y los conidios germinar en un amplio rango de temperaturas (5-30 °C) (Figura 9). La germinación no se produce con humedades relativas menores del 100 %, observándose a máxima germinación de conidios después de 24 horas de humectación. Cuando entre dos periodos de humectación se producen más de 10 horas seguidas de secado, la germinación se reduce considerablemente. La infección del níspero se produce a temperaturas comprendidas entre 10 y 20 °C, y la incidencia y severidad de la enfermedad se incrementa con el aumento de la duración del periodo de humectación (González-Domínguez *et al.*, 2013).

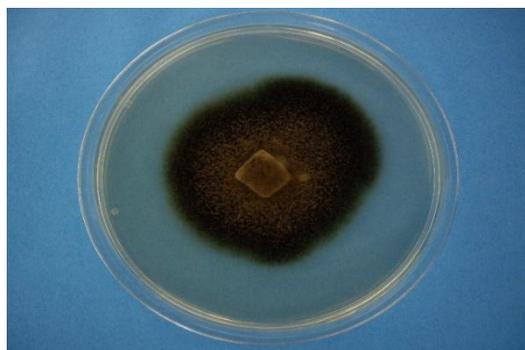


Figura 9. Crecimiento de cultivo de *Fusicladium eriobotryae* en placa Petri a 20 °C.

I. 3.3.3 Ciclo del patógeno

Estudios previos han dilucidado algunos de los aspectos relevantes de la biología y epidemiología de *F. eriobotryae* (Sánchez-Torres *et al.*, 2009; González-Domínguez *et al.*, 2013). La forma sexual de *F. eriobotryae* no ha sido encontrada. Los conidios asexuales de *F. eriobotryae* son abundantes en las lesiones en hojas y aun más abundantes en los frutos (Sánchez-Torres *et al.*, 2007b).

A continuación, se comenta el ciclo del moteado del níspero (Figura 10):

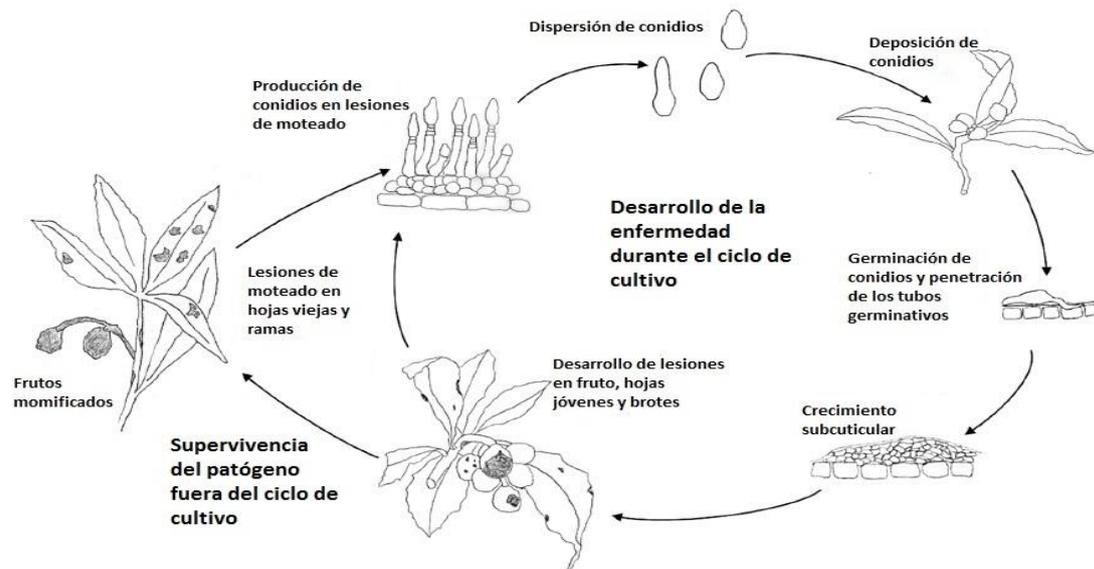


Figura 10. Ciclo patológico del moteado del níspero causado por *F. eriobotryae* (González-Domínguez *et al.*, 2014a).

En verano, durante la parada vegetativa del cultivo, el hongo sobrevive en las lesiones en ramas, hojas o frutos que se han producido durante ese año. Las altas temperaturas y falta de horas de humectación que se producen durante el verano previenen la esporulación de estas lesiones. En otoño, cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad, las lesiones del año anterior esporulan, sirviendo de inóculo primario, e infectando las hojas y frutos jóvenes. Los conidios de *F. eriobotryae* son dispersados principalmente por salpicaduras de lluvia a frutos y hojas cercanos; con condiciones favorables de temperatura y humectación, los conidios germinan y penetran los tejidos vegetales, directamente o a través de los estomas. Una vez que la infección se produce, el hongo crece subcuticularmente, los conidióforos rompen la cutícula del tejido y se producen nuevos conidios de *F. eriobotryae*. Estos conidios producirán infecciones secundarias durante todo el ciclo de cultivo, siempre que las condiciones ambientales sean favorables para la germinación, infección y crecimiento micelar (Morant, 2015).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El moteado del níspero causado por *Fusicladium eriobotryae* es la principal enfermedad que afecta al cultivo del níspero. Este hongo causa manchas en el fruto, depreciándolo para su comercialización, pudiendo alcanzar mermas superiores al 50 % de la cosecha. La enfermedad se desarrolla en condiciones de elevada tasa de humectación y una temperatura media de 20 °C y el síntoma más destacable son la presencia de manchas circulares en hojas y frutos. Se sabe que *F. eriobotryae* sobrevive en pequeñas manchas sobre las hojas, pero en la actualidad se desconocen otras posibles fuente de inóculo.

En este sentido, el objetivo de este trabajo es determinar mediante aislamientos en medio de cultivo, la visualización de esporas y el uso de técnicas moleculares (qPCR y nested-PCR), si los siguientes materiales vegetales: flores, pedúnculos, ramas y frutos momificados pueden constituir posibles fuentes de inóculo para *F. eriobotryae*.

III. DETECCIÓN DE POSIBLES FUENTES DE
INÓCULO DE *FUSICLADIUM*
ERIOBOTRYAE EN NÍSPERO

III. Detección de posibles fuentes de inóculo de *Fusicladium eriobotryae* en níspero.

III. 1. Materiales y métodos

III. 1.1 Localización y características de las parcelas muestreadas

Se seleccionaron dos parcelas cultivadas de níspero del cultivar “Algerie”, localizadas en el término municipal de “Callosa d’En Sarrià” situado en la provincia de Alicante (Comunidad Valenciana, España). Una de las parcelas se encontraba cubierta por una malla y la segunda parcela era sin malla. Estas parcelas fueron cedidas para el estudio por socios de la Cooperativa Agrícola de Callosa d’En Sarrià. En ambas parcelas, durante la campaña de cultivo no se realizaron tratamientos fungicidas para el control del moteado (Figura 11 y12).



Figura 11. Imagen de satélite de las parcelas de estudio en Callosa d’En Sarrià (SigPac).

III. 1.2 Toma de muestras

Se realizaron un total de tres muestreos de material vegetal en ambas parcelas (parcela bajo malla y parcela sin malla) en distintas fechas y distintos estados fenológicos (Tabla 2).

Tabla 2. Fechas de las tomas de muestras y estado fenológico de las parcelas.

Visita	Fecha	Estado fenológico
1	27/11/2015	Malla: 605-607
		Sin Malla: 601-605
2	27/01/2016	Malla: 701-709
		Sin Malla: 701
3	11/04/2016	Malla: 805-807
		Sin Malla: 801-805

En cada muestreo y por cada parcela (sin malla y con malla) se tomaron al azar 10 ramas de un año de edad, 10 pedúnculos y 10 frutos momificados (momias) de árboles mediante unas tijeras de podar. En caso del primer muestreo, realizado en floración, también se recogieron 10 inflorescencias por cada parcela.



Figura 12. Parcela con cultivo de níspero sin cubrir (izquierda) y parcela de cultivo de níspero con malla (derecha).

La descripción de los estados fenológicos (Martínez-Calvo *et al.*, 1999) son:

Estado principal 6: Floración

601 Comienzo de la floración: anthesis del 10% de las flores

605 Plena floración: al menos el 50% de las flores están en anthesis, caída de los primeros pétalos.

607 Las flores se marchitan: la mayor parte de los pétalos han caído.

Estado principal 7: Desarrollo del fruto

701 El fruto alcanza el 10% de su tamaño final.

705 El fruto alcanza el 50% de su tamaño final.

709 El fruto alcanza el 90% de su tamaño final.

Estado principal 8: Maduración del fruto

801 Los frutos comienzan a colorear

805 Aumento de la coloración del fruto, específica de cada cultivar.

807 Madurez de recolección.

III. 1.3 Análisis de las muestras

Una vez realizada la toma de muestras, el material vegetal se llevó al laboratorio de Patología Vegetal de la Universitat Politècnica de Valencia para su posterior análisis. Las muestras se conservaron en nevera a 4 °C hasta su procesamiento.

Para la detección de *F. eriobotryae* en las muestras se utilizaron tres metodologías diferentes: i) cámaras húmedas y aislamientos, ii) visualización de esporas de *F. eriobotryae* de los pellets extraídos de los lavados del material vegetal y iii) métodos moleculares para la detección de ADN del hongo, tanto del tejido vegetal de las muestras como de las posibles esporas o restos de micelio en los pellets.

A continuación se explica y se desarrolla el proceso que se ha llevado a cabo para cada tipo de muestra y procedimiento de detección de la posible presencia de *F. eriobotryae*:

III. 1.3.1 Aislamientos, extracción de tejido vegetal y lavado del material vegetal

Extracción porción vegetal

En primer lugar una parte del tejido vegetal de cada muestra se preservó a -20°C de temperatura hasta la posterior extracción de ADN y el análisis molecular. El resto de tejido se utilizó para realizar los aislamientos y lavados.

Realización del primer lavado

Una vez seleccionada la porción de tejido vegetal, se realizó el primer lavado. Para ello, cada muestra por separado se introdujo en un recipiente que contenía 20 ml de agua destilada estéril. Estos recipientes se agitaron durante 30 segundos para arrastrar las posibles esporas y restos de micelio superficiales presentes en el material vegetal. El líquido resultante se preservó a 4°C para su posterior observación de esporas al microscopio.

Realización de los aislamientos

Posteriormente al lavado, cada muestra se desinfectó superficialmente con alcohol al 70 % para evitar posibles contaminaciones de otros microorganismos durante su cultivo en el medio de crecimiento. Después, las muestras se incubaron en cámaras húmedas durante 2 días con el objetivo de que el hongo esporulara en las lesiones superficiales. Una vez transcurridos los dos días y producida la esporulación del material vegetal, se procedió al aislamiento del hongo en una cámara de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad. Con la ayuda de unas pinzas estériles se rascaban y se extraían pequeñas porciones de tejido esporulado y se sembraban siete puntos en placas Petri con medio de cultivo patata dextrosa agar (PDA) con 0,5 g/l de sulfato de estreptomicina (PDAS), realizándose una placa por muestra. Una vez realizada la siembra, las placas se incubaron a 20 °C en condiciones de oscuridad. Cada 2-3 días se revisaban las placas y se desechaban las zonas contaminadas de las placas y las placas

contaminadas completando un periodo de incubación de 21 días. Asimismo, las posibles colonias que se asemejaban a *F. eriobotryae* se repicaban a otra placa Petri con medio de cultivo PDA, incubándose también a 20 °C en condiciones de oscuridad. Finalmente se contaban el número total de positivos por cada placa siendo 7 el 100 % y 0 el 0 %.

Realización del segundo lavado

Por otro lado, una vez realizada la siembra en placas Petri las muestras de material vegetal, antes de ser desechadas, se volvían a lavar para obtener las posibles esporas o micelio de *F. eriobotryae*, como se ha explicado anteriormente para el primer lavado y los recipientes con líquido se volvían a guardar en cámara a temperatura de 4 °C, para no dañar el material biológico.

En total se hicieron 200 aislamientos con un total de 1400 puntos de siembra, 200 extracciones de tejido vegetal para el análisis del ADN, y 400 recipientes de lavado para la observación y conteo de esporas y su posterior análisis de ADN.

III. 1.3.2 Preparación de los pellets y visualización de esporas

Para poder realizar el conteo de esporas y la extracción de ADN de los líquidos de lavado fue necesario eliminar el agua de los recipientes y concentrar el material en suspensión. Para ello, una vez realizado el primer y el segundo lavado, los recipientes con los 20 ml de agua y la suspensión de restos de tejido vegetal, micelio, esporas y otros residuos fueron homogenizados con la adición de agua destilada estéril hasta llegar a los 100 ml en total y se introdujeron en tubos especiales para centrífuga Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), durante 15 minutos a 5.000 revoluciones por minuto (rpm) siguiendo las condiciones descritas por Agustí-Brisach *et al.* (2013). Una vez realizada la centrifugación de los recipientes, se descartó el sobrenadante y se recogió el precipitado (alrededor de 1 ml) que se depositó en un tubo eppendorf de 1,5 ml.

Antes de realizar el conteo mediante el microscopio, los eppendorf se volvían a centrifugar esta vez en un equipo de Eppendorf® Centrifuge 5415D durante 5 minutos a 10.000 rpm, se volvía a tirar el sobrenadante y se conservaba el precipitado para su posterior observación al microscopio. Para la preparación de la muestra se extraía una pequeña porción de pellet con una pinza y se ponía en un portaobjetos con una gota de agua. Mediante la ayuda de un microscopio a 40 aumentos, se observaban la posible presencia de esporas de *F. eriobotryae* contenidas en los pellets y se anotaban los posibles positivos que se intentaría confirmar mediante técnicas moleculares.

III. 1.3.3 Extracción de ADN

Debido a que se trabajó con dos tipos de muestras distintas, el procedimiento de extracción de ADN es distinto y por ello se describe por separado.

Tejido vegetal

Para la extracción de ADN en las muestras de tejido vegetal, se pesaban 40 mg por cada muestra y se ponían en tubos de 2 ml junto con 2 bolas de acero de 3 mm de diámetro en el caso de las muestras de inflorescencias y 6 bolas de acero de 2,38 mm para las muestras de pedúnculos, ramas y momias. Para hacer la extracción se utilizó el kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit. Inicialmente, en cada tubo se añadieron 650 µl de tampón P1. A continuación, los tubos se pusieron en un equipo de homogenización FastPrep-24TM5G (MP Biomedicals, California, USA) a una velocidad de 6 m/s y 40 segundos de tiempo, con el objetivo de facilitar la rotura de los tejidos. Una vez realizada la homogenización de los tejidos, las muestras se incubaron durante 5 minutos a 65 °C y se agitaron 5 segundos a la mitad del tiempo. Posteriormente, se añadieron 140 µl de tampón P2 y se mezclaron con un vórtex, sometiendo después los tubos a centrifugación (13.000 r.p.m., 10 minutos). Tras completar el paso anterior, se trasladaron 600 µl del sobrenadante resultante a un tubo Eppendorf con 600 µl de etanol absoluto y 300 µl de tampón P3. La mezcla se homogeneizó con un vórtex durante unos segundos. Acto seguido, se transfirieron 800 µl de la mezcla a una columna de filtrado (Canvax, Córdoba, España) sobre un tubo de 2 ml para su posterior centrifugación (10.000 r.p.m., 1 min) y un paso final de centrifugación sin añadir el tampón para descartar el líquido residual. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo Eppendorf con 50 µl de tampón de elución previamente calentado a 65 °C. Se incubó durante 3 minutos y se centrifugó (10.000 r.p.m., 1 min), recuperando el líquido extraído.

Pellets procedentes de los lavados

Para la extracción de ADN de los pellets procedentes de los lavados realizados se hicieron con la misma metodología anteriormente descrita con la diferencia que para la rotura de los tejidos se usó un volumen de 0,5 ml de bolas de 0,5 mm de diámetro (ZymoResearch, USA) para facilitar la rotura de las esporas y micelio.

III. 1.3.4 Detección mediante qPCR

En este trabajo se empleó la técnica de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) para la detección y cuantificación molecular de *F. eriobotryae*. En las muestras en las que se observaron inhibiciones se realizaron diluciones y, si aun así, mostraban inhibición, se realizaba una “nested-PCR”.

Preparación de diluciones de ADN

Para la realización del análisis de cuantificación es necesario añadir junto con las muestras una serie de diluciones de concentración conocida a partir de las cuales se establece el umbral para discernir si las muestras presentan un resultado positivo o negativo para *F. eriobotryae*.

Estas diluciones proceden de un cultivo puro del aislado Fe40, un cultivo representativo y bien caracterizado de *F. erobotryae* obtenido de la colección de hongos del Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo (UPV), la extracción se realizó de la misma forma que los tejidos vegetales (Kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit), y las diluciones se obtuvieron mediante 7 diluciones seriadas 1:10.

Paralelamente, se cuantificó la concentración de ADN (ng/ μ l) del cultivo puro mediante fluorimetría empleando el Kit Qubit Fluorometric Quantitation (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

qPCR

Para el análisis de las muestras mediante qPCR y se emplearon cebadores específicos para la detección de *F. erobotryae*, FUG2F (5'-GAATGAGAAGACCTACGACC-3') y FUG2R (5'-AAGTCAGTAGTCTGTATGA-3') en proceso de publicación (Figura 13).

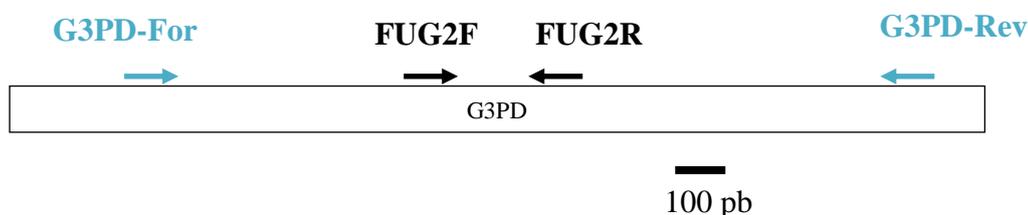


Figura 13. Esquema de la localización de los cebadores específicos empleados en el trabajo FUG2F-FUG2R (datos no publicados) y los cebadores que amplifican una secuencia parcial (1250 pb) del gen gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PD) (Sánchez-Torres *et al.*, 2009).

Para cada muestra se prepararon por duplicado reacciones de 20 μ l que consistían en 18 μ l de una mezcla madre (“master mix”) (Tabla 3) y 2 μ l de ADN de cada muestra, que se emplean como ADN molde, para que todas las muestras estuviesen sometidas a las mismas condiciones experimentales. Por otro lado, para comprobar que no hubiese inhibiciones en una de las dos repeticiones se añadió 2 μ l de las diluciones realizadas con el aislado Fe40 anteriormente realizada. Además, se incluían controles negativos que solo contenían la mezcla madre, y controles positivos que contenían la mezcla madre y 2 μ l de ADN de una muestra de las diluciones de Fe40. Posteriormente, cada reacción se dispuso en tubos PCR® Strip Tubes & Caps (Axygen, CA, USA) y la qPCR se llevó a cabo en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) bajo las condiciones descritas en la Tabla 4.

Tabla 3. Concentración y volumen de los componentes de la mezcla madre de qPCR

Componente	Concentración final	Volumen (1 reacción)
SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (1x)	1x	12,5 µl
Primer directo (µM)	0,4 µM	1 µl
Primer reverso (µM)	0,4 µM	1 µl
H ₂ O		3,5 µl

Fase		Condiciones
Desnaturalización inicial		95 ° C 30s
Amplificación 50 ciclos	Desnaturalización	95 ° C 5s
	Alineamiento	60 ° C 30s
"Melting" (fusión)		50 ° C - 95 ° C

Diluciones de las muestras inhibidas

Las muestras de ADN que presentaban inhibición se diluían a 1:10 mediante un tampón de elución (Kit E.Z.N.A Plant Miniprep Kit) a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaba una qPCR de la misma forma descrita anteriormente, para comprobar si se había eliminado la inhibición.

Nested PCR

En aquellas muestras que seguían mostrando inhibición se llevó a cabo una nested PCR, que consiste en realizar una primera ronda de ampliación de ADN mediante una PCR convencional y una segunda ronda mediante qPCR, utilizando como ADN molde los productos obtenidos en la primera.

Primera ronda – PCR convencional: Se realizó siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado anterior de qPCR. Pero cada reacción se dispuso en tubos eppendorf de 0,5 ml y se introdujo en un termociclador Veriti™ 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA, USA) bajo las condiciones de la (tabla 5).

Tabla 4. Condiciones de reacción para PCR.

Fase	Condiciones
Desnaturalización inicial	95 ° C 1 min.

Amplificación 20 ciclos	Desnaturalización	95 °C 5 s
	Alineamiento	60 °C 30 s
	Elongación	72 °C 40 s
Extensión final		72 °C 10 min.

Segunda ronda – qPCR: esta segunda ronda se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente (apartado qPCR, Tablas 3 y 4) utilizando como ADN molde el producto obtenido en la PCR convencional.

Recta de calibrado y obtención de la concentración de las muestras

Para la recta de calibrado se representó el logaritmo decimal de concentraciones conocidas de ADN (ng/μl) a partir de las diluciones de cultivo puro de *F. eriobotryae* empleadas en la qPCR frente al valor de Ct (“Cycle threshold”).

A partir del valor Ct de las muestras analizadas, que fueron las procedentes de los tejidos vegetales y lavados, se estimó la concentración de ADN de *F. eriobotryae* en cada muestra empleando la ecuación obtenida en la recta de calibrado. Finalmente, se utilizó un programa de curvas de “melting” para identificar productos inespecíficos que pudiesen resultar en falsos positivos.

III. 2.Resultados y discusión

III. 2.1 Detección por aislamiento

Mediante la detección por aislamiento, a partir de algunas muestras se observó el crecimiento de colonias parecidas morfológicamente a las colonias de *F. eriobotryae*, que posteriormente fueron repicadas en otra placa. Una vez crecidas las colonias, se observaron las estructuras producidas en el medio de cultivo donde se confirmó que no se trataban de colonias de *F. eriobotryae*. Del total de 200 muestras analizadas y de las 1400 siembras que se realizaron mediante aislamiento en medio de cultivo PDAS no se obtuvo ningún positivo. Cabe destacar que las condiciones de cultivo y crecimiento fueron las adecuadas para el hongo de acuerdo con el estudio realizado por González-Domínguez *et al.* (2013) donde se describían los factores ambientales de crecimiento de micelio y germinación de conidios en *F. eriobotryae*.

En los aislamientos que se realizaron se pudo observar una elevada presencia y crecimiento de otros microorganismos, como hongos saprofitos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, etc. y bacterias, sobre todo en los materiales vegetales más viejos como momias y ramas que procedían del año anterior a la toma de muestras. En cambio, en los materiales vegetales más jóvenes como pedúnculos y flores,

procedentes del mismo año a la toma de muestras, se observó un menor crecimiento de otros microorganismos.

Uno de los motivos que podrían explicar la ausencia de positivos en los aislamientos a partir del material vegetal analizado es la dificultad que presenta el hongo para el aislamiento en placa Petri con medio de cultivo ya que se trata de un hongo que presenta un crecimiento mucho más lento comparado con el de otros microorganismos que podrían estar presentes en las muestras (González-Domínguez, 2014d). Sin embargo, se trata de una técnica adecuada para otros patógenos fúngicos como demuestra un estudio elaborado por Villarino *et al.* (2010) sobre las fuentes de inóculo primario de *Monilia* spp. causante de la podredumbre parda en el melocotonero. En este trabajo se demostró que la fuente de inóculo principal del hongo era los frutos momificados mediante la realización de aislamientos a partir de este material en medio de cultivo, siguiendo un protocolo similar al que hemos utilizado en este trabajo.

III. 2.2 Visualización de esporas de los pellets procedentes de lavados

En el proceso de visualización de los pellets, se observaron gran cantidad esporas de diferentes hongos en las muestras obtenidas del primer lavado (realizado antes de la cámara húmeda) de los materiales vegetales jóvenes procedentes de flores y pedúnculos, en comparación con las muestras obtenidas en el segundo lavado (realizado después del aislamiento) en las que el número de esporas fue mucho menor. Por otra parte, para los materiales más viejos, como ramas y momias, tanto en el primer lavado y segundo lavado se obtuvieron gran cantidad de esporas. Esto concuerda con lo visto en los aislamientos donde se observaron un mayor número de colonias creciendo en medio de cultivo comparado con lo que observó en los aislamientos de flores y pedúnculos. Además, la mayoría de esporas pertenecían a los mismos géneros de hongos saprofitos indicados anteriormente. Por tanto, se podría asumir que los tejidos procedentes de ramas y momias sí presentaban infecciones latentes o colonización por diferentes hongos saprofitos. La técnica de los lavados utilizada en este trabajo se utilizó también en el estudio realizado por Onesti *et al.* (2016) para evaluar la capacidad de producción de conidios del hongo patógeno de la vid *Guignardia bidwellii* en diferentes tipos de muestras vegetales. Estos autores encontraron que el número de esporas disminuía a medida que aumentaba el tiempo entre lavados, esto es, porque antes de hacer algún lavado la superficie está llena de esporas y luego en los posteriores lavados las esporas recogidas proceden de los tejidos infectados que han esporulado de nuevo, siendo su cantidad menor.

En el presente trabajo, se puede decir que la técnica de lavados fue exitosa para la recogida de esporas así como de micelio, ya que fue posible recoger esporas de otros hongos después del primer y segundo lavados. También hay que añadir que la visualización e identificación morfológica de esporas en el microscopio fue un proceso arduo y difícil, debido a la gran cantidad de esporas de diferentes especies y de otros hongos similares a *F. erobotryae*.

Un ejemplo de la aplicación de la técnica de visualización de esporas en material vegetal para la detección de fuentes de inóculo es el trabajo realizado en California por Michailides (1991) para la identificación de fuentes de inóculo de *Botryosphaeria dothidea* en pistacho. En este caso, el proceso fue más sencillo, ya que se utilizaba directamente la observación de picnidios de tejidos infectados sin tener que utilizar otros métodos complementarios de detección.

Del total de muestras visualizadas se pudieron observar posibles esporas similares a *F. eriobotryae* en cuatro muestras: una muestra de flores del primer lavado procedente del primer muestreo de la parcela sin malla; en dos muestras de pedúnculo del segundo lavado procedentes una de ellas de la parcela sin malla y la otra de la parcela cubierta; y en una muestra de momia del segundo lavado procedente del tercer muestreo de la parcela con malla. La comprobación de estos posibles positivos quedó pendiente para su análisis mediante qPCR. Las técnicas moleculares de detección complementan las técnicas más tradicionales (aislamiento y visualización de esporas) aportando mayor sensibilidad en la detección.

III. 2.3 Detección mediante técnicas moleculares (qPCR)

Recta de calibrado y determinación del límite de detección

La concentración inicial de partida obtenida a partir de la extracción de ADN del cultivo puro de referencia resultó ser 100 ng/μl. La recta de calibrado obtenida tras la realización de la qPCR con las diluciones seriadas (Figura 14) mostró que la mínima concentración de ADN de *F. eriobotryae* detectable fue la dilución D6 por lo que el límite de detección (LD) se fijó en 10 fg/μl.

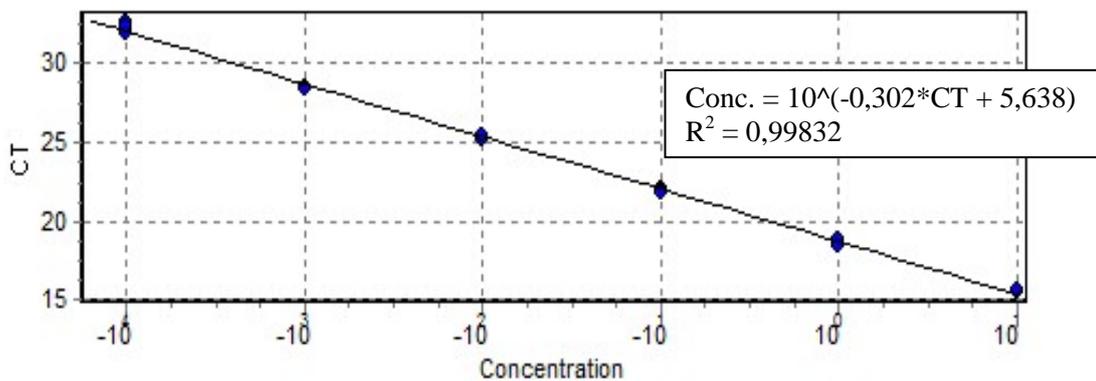


Figura 14. Recta de calibrado en la que se representa la concentración de ADN (fg/μl) frente al valor de Ct.

A partir de la recta de calibrado es posible calcular la concentración de ADN de *F. eriobotryae* (fg/μl) para las muestras procedentes de las porciones de tejido vegetal y de los pellets procedentes de los lavados.

Análisis de las muestras

Analizadas las muestras procedentes de los distintos materiales vegetales (flores, pedúnculos, ramas y momias) y de las muestras procedentes de los dos lavados, mediante qPCR para la amplificación y cuantificación del ADN de *F. eriobotryae*, se observó que del total de las muestras ninguna resultó positiva, incluyendo las muestras donde se habían visto posibles esporas del patógeno. En las muestras donde hubo inhibición una vez diluidas tampoco se obtuvo ningún positivo de *F. eriobotryae*. Por último las muestras que presentaron inhibición incluso después de haber sido diluidas, y que posteriormente se analizaron mediante nested-PCR tampoco resultaron positivas.

La falta de positivos puede ser debido a la baja concentración del patógeno y a la presencia de compuestos inhibidores en las muestras, limitaciones que no se pudieron solventar mediante diluciones o aplicando nested-PCR. Esta problemática se observó también en el estudio realizado en Sudáfrica por Retief *et al.* (2006) para la búsqueda de fuentes de inóculo de *Phaemoniella clamydospora* en viveros de viña. En este trabajo utilizaron nested-PCR para la detección del hongo en muestras procedentes de agua, suelo y madera de vid, ya que la utilización de PCR convencional no resultó suficientemente sensible y específica (LD de 10 fg comparado con 1 pg, respectivamente). También, se utilizó nested-PCR para evitar inhibiciones en las muestras analizadas en otro estudio con el objetivo de cuantificar *Ilyonectria* spp. asociado con la enfermedad del pie negro en vid en suelos de viveros de viña en la Comunidad Valenciana (Agustí-Brisach *et al.*, 2014). En el presente trabajo, aplicar nested-PCR desde un principio al análisis de todas las muestras podría haber sido una manera de evitar las inhibiciones de las muestras, haciendo la técnica más sensible a concentraciones de ADN de *F. eriobotryae* por debajo del LD. Sin embargo, esta variante de la PCR tiene también otros inconvenientes como un elevado riesgo de contaminación de las muestras obteniendo falsos positivos (Olmos *et al.*, 1999). Por otra parte, otra forma para evitar los problemas asociados a la presencia de inhibidores sería mediante la utilización de otro kit de extracción con el que pudiera obtenerse un ADN genómico más limpio.

Una posible explicación para los resultados obtenidos en los aislamientos, la visualización de esporas y la detección mediante técnicas moleculares (qPCR), sería la falta o escasa infección de los tejidos vegetales relacionada con las condiciones ambientales que se han dado en las últimas campañas. La escasez de lluvia registrada en los últimos años en el municipio de Callosa d'En Sarrià podría relacionarse con la ausencia o bajo nivel de infección. Según el estudio realizado por González-Domínguez *et al.* (2014a) sobre la dispersión de los conidios de *F. eriobotryae*, la vía principal de transmisión de esporas de los tejidos infectados a partes sanas de la planta es la lluvia. Para justificar esta hipótesis se ha calculado el riesgo de infección de los años anteriores de la toma de muestras con la ayuda del modelo epidemiológico del moteado del níspero (Eriscab) utilizando los datos climáticos de temperatura media, horas

de agua libre y precipitación diaria registrados en la estación climática de Callosa d'En Sarrià. Este modelo epidemiológico ha sido desarrollado y validado por González-Domínguez *et al.* (2014b) para predecir el riesgo de infección de moteado del níspero a partir de las condiciones ambientales. Este modelo, a su vez, ha sido utilizado y comprobado con éxito en distintos lugares de España e Italia (Morant, 2015; González-Domínguez *et al.*, 2014c).

En las Figuras 15, 16, y 17 se puede observar la predicción de riesgo de moteado del níspero obtenida a partir del modelo epidemiológico (Eriscab) para las campañas de cultivo del: 2013-2014, 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. Para que el riesgo de infección sea considerado y se recomiende la aplicación de un tratamiento en campo, el valor mínimo de riesgo que se debe obtener es de 0,5-0,6. A su vez se relacionan estos valores con el desarrollo de los síntomas de la enfermedad en la planta transcurridos unos días.

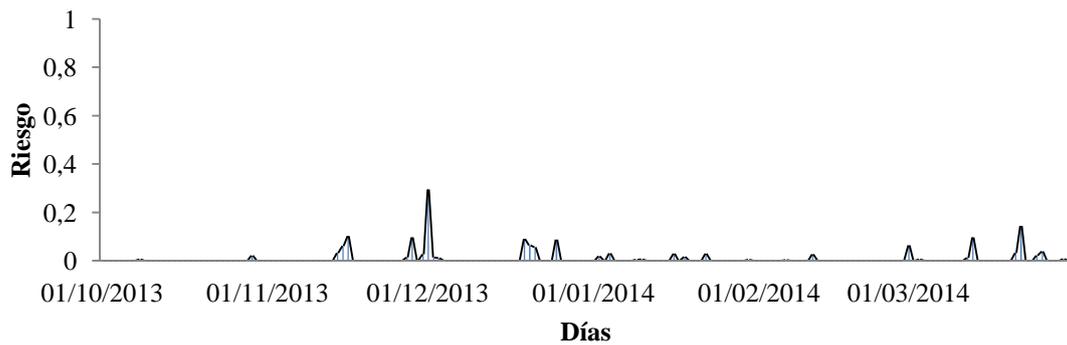


Figura 15. Riesgo de infección diario por *Fusicladium eriobotryae* en la localidad de Callosa d'En Sarrià indicado por programa “EriScab” en el periodo del 1 de octubre al 31 de marzo, de la campaña 2013-2014.

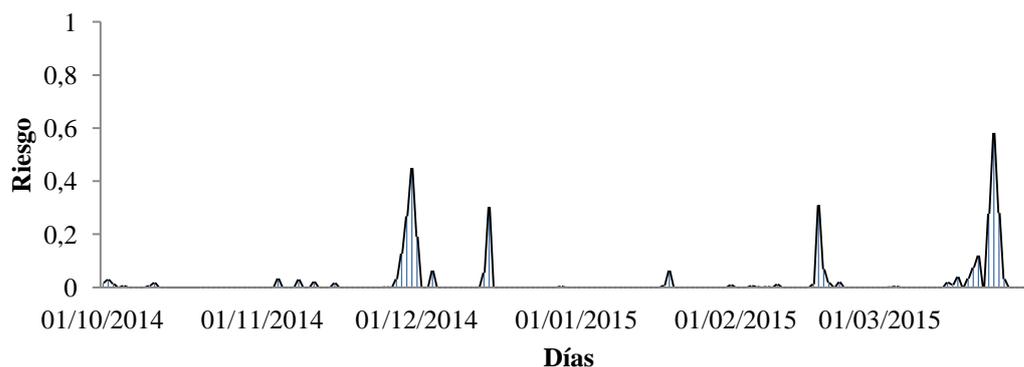


Figura 16. Riesgo de infección diario por *Fusicladium eriobotryae* en la localidad de Callosa d'En Sarrià indicado por programa "EriScab" en el periodo del 1 de octubre al 31 de marzo, de la campaña 2014-2015.

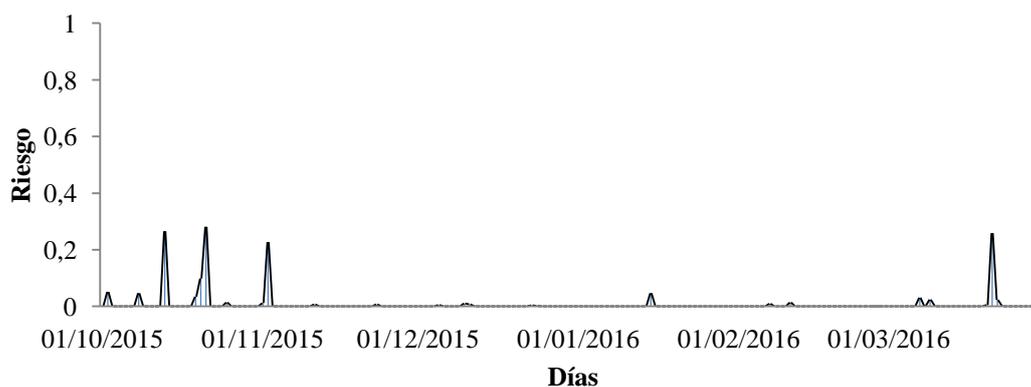


Figura 17. Riesgo de infección diario por *Fusicladium eriobotryae* en la localidad de Callosa d'En Sarrià indicado por programa "EriScab" en el periodo del 1 de octubre al 31 de marzo, de la campaña 2015-2016.

Se puede observar que en las dos campañas anteriores a la toma de muestras (Figuras 15 y 16) el riesgo de infección fue inferior de 0,5-0,6 por lo tanto no se dieron las condiciones favorables para que *F.eriobotryae* infectara las plantas, dando lugar a gran cantidad de inóculo disponible para la campaña siguiente. Solo a finales de marzo de la campaña de níspero (2014-2015) se registró un valor elevado de riesgo de infección en los tejidos susceptibles (hojas, frutos, y brotes jóvenes). Sin embargo, este momento coincide con la época de recolección del fruto y cuando los tejidos de brotes jóvenes comienzan a lignificarse siendo más difícil la infección aunque se den las condiciones favorables para que ésta tenga lugar. Por lo tanto, es difícil que en la campaña de cultivo siguiente (2015-2016), correspondiente con el de la toma de muestras, hubiera inóculo disponible, por ejemplo en momias, que pudiera afectar al material vegetal de ramas de primer año. Dado que en las dos últimas campañas anteriores a

la toma de muestras no se dieron condiciones adecuadas para la propagación e infección de *F. eriobotryae*, las fuentes de inóculo fueron escasas y esto explicaría los resultados negativos en la detección del hongo en los materiales muestreados. Esta tendencia se puede observar en un estudio desarrollado por González-Domínguez *et al.* (2014a) para la validación del modelo “Eriscab” en el que se observó un incremento de la infección durante el estudio debido a las condiciones climáticas favorables que se dieron para la propagación e infección del hongo alcanzado en el tercer y último año la mayor presencia del hongo. En la Figura 17 se puede observar que el riesgo de infección y propagación de *F. eriobotryae* en la campaña 2015-2016 fue escasa o nula, ya que no se dieron las condiciones ambientales adecuadas para ello. Por ello, es difícil que el material vegetal joven (flores y pedúnculos) fuera infectado en esa campaña y, por lo tanto, esto concuerda con que no se haya detectado ninguna muestra positiva y no se pueda demostrar que flores y pedúnculos sean una fuente de inóculo.

Cabe la posibilidad de que, dado el escaso riesgo de infección y de inóculo de los años anteriores al muestreo, el número de muestras analizadas no haya sido suficientemente representativo para detectar el patógeno. Por último, también hay que considerar que *F. eriobotryae* se pudiera encontrar en otro tipo de materiales vegetales no muestreados, por ejemplo en la corteza del árbol, aunque parece difícil que allí estuviera presente en una mayor concentración que en las momias de los frutos.

Por tanto, para la determinación de las posibles fuentes de inóculo de *F. eriobotryae* en níspero, se necesitará ampliar los trabajos de detección de este hongo patógeno en nuevas campañas de cultivo, en las que las condiciones ambientales sean más favorables para la infección y desarrollo del hongo en parcelas de níspero tanto con, como sin, cubierta de malla.

IV. CONCLUSIONES

IV. Conclusiones

Del trabajo realizado se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- No se logró aislar el hongo *Fusicladium eriobotryae* en medio de cultivo a partir de tejidos procedentes de flores, pedúnculos, ramas y momias.
- No se detectaron esporas de *F. eriobotryae* en los pellets procedentes de los lavados (primero y segundo) de las muestras de los diferentes materiales vegetales estudiados.
- Mediante técnicas de qPCR y nested-PCR tampoco se detectó *F. eriobotryae* ni en las porciones de tejido de las muestras vegetales muestreados ni en los pellets procedentes del primer y segundo lavado.

V. BIBLIOGRAFÍA

V. BIBLIOGRAFÍA

- AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. (2013).** Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. *Eur J plant Pathol*, 137: 103-112.
- AGUSTÍ-BRISACH, C.; MOSTERT, L.; ARMENGOL, J. (2014).** Detection and quantification of *Ilyonectria* spp. associated with black-foot disease of grapevine in nursery soils using multiplex nested PCR and quantitative PCR. *Plant pathology*, 63: 316-322.
- AGUSTÍ, M. (2010).** Fruticultura. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- AGUSTÍ, M.; REIG, C.; UNDURRAGA, P. (2006).** El cultivo del níspero japonés. Edita Manuel Agustí Fonfria y Carmina Reig Valor. Alcoi. 302 pp.
- AGUSTÍ, M.; REIG, C. (2006).** Morfología y anatomía. En AGUSTI, M.; REIG, C.; UNDURRAGA, P. (2006). El cultivo del níspero japonés. Edita Manuel Agustí Fonfria y Carmina Reig Valor. Alcoi: 49-72.
- CABALLERO, P. y FERNANDEZ, M.A. 2002.** Loquat, production and market. *Options Méditerranéennes*, 58: 11-20.
- CAUTÍN, R.; CASTRO, C.; REIG, C.; AGUSTI, M. (2006).** Técnicas de cultivo. En AGUSTI, M.; REIG, C.; UNDURRAGA, P. (2006). El cultivo del níspero japonés. Edita Manuel Agustí Fonfria y Carmina Reig Valor. Alcoi: 163-200.
- CALABRESE, F. (2006).** Origen de la especie. En AGUSTI, M.; REIG, C.; UNDURRAGA, P. (2006). El cultivo del níspero japonés. Edita Manuel Agustí Fonfria y Carmina Reig Valor. Alcoi: 17-26.
- GARIGLIO, N.F. (2006).** Ecosfisiología del níspero. En AGUSTI, M.; REIG, C.; UNDURRAGA, P. (2006). El cultivo del níspero japonés. Edita Manuel Agustí Fonfria y Carmina Reig Valor. Alcoi: 73-90.
- GARIGLIO, N.; CASTILLO, A.; JUAN, M.; ALMELA, V.; AGUSTÍ, M. (2002)** El níspero japonés: Técnicas para mejorar la calidad del fruto. Consellería de Agricultura, Pesca y alimentación. Valencia, España.
- GISBERT, A.D.; BESOAIN, X.; LLÁCER, G.; BADENES, M.L. (2006).** Protección del cultivo II: Enfermedades. En AGUSTI, M.; REIG, C.; UNDURRAGA, P. (2006). El cultivo del níspero japonés. Edita Manuel Agustí Fonfria y Carmina Reig Valor. Alcoi: 227-246.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E.; ARMENGOL, J.; ROSSI, V. (2014a).** Development and validation of a weather-based model for predicting infection of loquat fruit by *Fusicladium eriobotryae*. *Plos one* 9, e107547: 1-12.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E.; ROSSI, V.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. (2013).** Effect of environmental factors on mycelial growth and conidial germination of *Fusicladium eriobotryae*, and the infection of loquat leaves. *Plant disease*, 97: 1331-1338.

- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E.; ROSSI, V.; MICHEREFF, S.J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. (2014b).** Dispersal of conidia of *Fusicladium eriobotryae* and spatial patterns of scab in loquat orchards in Spain. *European Journal Plant Pathology*, 139: 849-861.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ROSSI, V. (2014c).** Desarrollo y validación de un modelo epidemiológico para predecir el moteado causado por el hongo *Fusicladium eriobotryae* sobre frutos de níspero. *Phytoma España*. 263: 15.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E. (2014d).** Biology, epidemiology and control of *Fusicladium eriobotryae*, causal agent of loquat scab. Tesis doctoral en Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Valencia. 172 pp.
- MAPAMA, (2014).** Ministerio Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Guía de Gestión Integrada de Plagas, Frutales de Pepita.
- MAPAMA, (2017).** Anuario de estadística del 2015 del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, <http://www.magrama.gob.es>. Fecha de consulta 22/06/2017.
- MARTÍNEZ-CALVO, J.; BADENES, M.L.; LLÁCER, G.; BLEIHOLDER, H.; HACK, H.; MEIER, U. (1999).** Phenological growth stages of loquat tree (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Annals of Applied Biology*, 134: 353-357.
- MICHAILIDES, T.J. (1991).** Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology*, 81: 566-573.
- MORANT, V. (2015).** Seguimiento epidemiológico del moteado del níspero causado por *Fusicladium eriobotryae*. Trabajo fin de grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural. Universidad Politécnica de Valencia. 32 pp.
- OLMOS, A.; CAMBRA, M.; ESTEBAN, O.; GORRIS, M.T.; TERRADA, E. (1999).** New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic Acids Research*, 27(6): 1564-1565.
- ONESTI, G.; GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E.; ROSSI, V. (2016).** Production of *Guignardia bidwellii* conidia on grape leaf lesions is influenced by repeated washing events and by alternation of dry and wet periods. *Eur J Plant Pathol*, 147: 949-953.
- REIG, C. (2010).** La acción del fruto en el control del desarrollo del níspero japonés (*Eriobotrya Japonica* Lindl). Tesis doctoral en Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Valencia. 228 pp.
- RETIEF, E.; McLEOD, A.; FOURIE, P.H. (2006).** Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology*: 115: 331-339.
- RODRIGUEZ, A. (1983).** El cultivo del níspero y el valle de Algar-Guadalest. Sociedad Cooperativa de Crédito de Callosa De Ensarriá

SÁNCHEZ TORRES, P.; HINAREJOS, R.; TUSET, J.J. (2007a). *Fusicladium eriobotryae*: hongo causante del moteado del níspero en el Mediterráneo español. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, 33: 87-98.

SÁNCHEZ TORES, P.; HINAREJOS, R.; TUSET, J.J. (2007b). Identification and characterization of *Fusicladium eriobotryae*: fungal pathogen causing Mediterranean loquat scab. *Acta Horticulturae*, 750: 343-347

SÁNCHEZ TORES, P.; HINAREJOS, R.; TUSET, J.J. (2009). Characterization and pathogenicity of *Fusicladium eriobotryae*, the fungal pathogen responsible for loquat scab. *Plant disease*, 93: 1151-1157

VILLARINO, M.; MELGAREJO, P.; USALL, J.; SEGARRA, J.; DE CAL, A. (2010). Primary inoculum sources of *Monilinia* spp. in Spanish peach orchards and their relative importance in brown rot. *Plant Dis.* 94: 1048-1054.

Páginas web consultadas

<http://sigpac.mapa.es/fega/visor/#>