

TESIS DOCTORAL

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL: “Study of diseases caused by *Diaporthe amygdali* and oomycetes on almond crops”.

DOCTORANDO: Francisco Beluzán Flores

PROGRAMA DE DOCTORADO: Recursos y Tecnología Agrícolas (Universitat Politècnica de València, UPV).

DIRECTORES: Paloma Abad Campos y Josep Armengol Fortí (Universitat Politècnica de València, UPV).

CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION: Tesis Doctoral realizada en el Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València, en el marco de los proyectos RTA2017-00009-C04-04 y PID2020-114648RR-C33 financiados por la Agencia Estatal de Investigación, y la concesión de una beca predoctoral de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo/Subdirección de Capital Humano/Doctorado Becas Chile en el Extranjero/72200145.

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: la defensa de tesis se realizó el viernes 19 de abril a las 11:00 en el Salón de Grados de la ETSIAMN, Edificio 3P, Universitat Politècnica de València.

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: Antonieta De Cal y Cortina (presidenta), Soledad Martos Arias (vocal) y Mónica Berbegal Martínez (secretaria).

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*.

RESUMEN: Esta Tesis Doctoral se centra en dos problemas fitopatológicos importantes que afectan al cultivo del almendro en España. El primero es el hongo *Diaporthe amygdali*, agente causal del chancro de las ramas y muerte de los brotes, y el segundo está relacionado con oomicetos asociados con la pudrición de la raíz y cuello de los almendros.

En primer lugar, estudiamos el papel de las condiciones climáticas en la dispersión del inóculo de *D. amygdali* en cultivos de almendro en condiciones mediterráneas. Para ello, se desarrolló un ensayo qPCR para la detección y cuantificación de inóculo aéreo de *D. amygdali*, incluyendo el diseño de un par de cebadores específicos para esta especie. Esta metodología se utilizó para estudiar la dinámica del inóculo de *D. amygdali* en trampas de esporas colocadas en dos huertos de almendros de diferentes ubicaciones, en dos temporadas de crecimiento (2019-2020 y 2020-2021). Con los datos climáticos registrados se construyó un modelo Hurdle de dos partes; la primera parte relacionó la presencia o ausencia de ADN de *D. amygdali* (Bernoulli o cualitativa) y la otra consideró la concentración promedio de ADN del hongo (Gamma o cuantitativa).

Después del análisis, se observó que algunas variables climáticas incidieron positivamente y otras negativamente, en ambas partes del modelo. El efecto de la temperatura estuvo relacionado con la amplitud térmica diaria; los rangos térmicos más amplios redujeron la concentración de ADN, mientras que los rangos térmicos más estrechos aumentaron la detección de ADN. Los días con un promedio de humedad relativa superior al 80% tuvieron un efecto negativo en la concentración de ADN de *D. amygdali*. Las precipitaciones tuvieron una influencia positiva en ambas partes del modelo, confirmando la contribución de la lluvia en la dispersión del inóculo. Finalmente, la variable velocidad del viento influyó positivamente en ambas partes del modelo, en ambas temporadas de crecimiento.

El estudio anterior se complementó con la evaluación de la susceptibilidad a este hongo de variedades de almendro ampliamente utilizadas en la cuenca mediterránea. En ensayos de laboratorio, se inocularon ramitas de 25 cultivares de almendro con cuatro aislados de *D. amygdali*, mientras que las inoculaciones de campo implicaron la inoculación de brotes en crecimiento de cultivares de almendro injertados en el portainjerto 'GF-677', durante cuatro años. En ambos tipos de experimentos, el inóculo consistió en discos de agar con micelio, que se insertaron debajo de la corteza y se midió la longitud de las lesiones causadas por el hongo. Todos los cultivares evaluados mostraron lesiones necróticas en respuesta a *D. amygdali*, confirmando su susceptibilidad. El análisis de conglomerados clasificó los cultivares como susceptibles o muy susceptibles. Las características agronómicas, como el tiempo de floración y maduración, se vincularon con la susceptibilidad de los cultivares. Los cultivares de floración tardía, muy tardía y de maduración temprana a media, mostraron una alta susceptibilidad.

Respecto a los oomicetos fitopatógenos, se realizó un estudio para determinar la prevalencia de estos patógenos en zonas productoras de almendro en España. Se realizaron prospecciones entre 2018 y 2020 en seis provincias españolas, para recolectar e identificar oomicetos asociados con síntomas de pudrición de raíz y cuello en almendros. Se obtuvieron un total de 104 aislados de oomicetos procedentes de árboles enfermos, y la secuenciación de la región espaciadora transcrita interna (ITS) identificó especies de diferentes géneros, incluidos *Globisporangium*, *Phytophthora* (*Ph.*), *Phytophthium* (*Pp.*) y *Pythium*. *Phytophthium vexans* y *Ph. niederhauserii* fueron las especies más frecuentes. Las pruebas de patogenicidad en plantas de almendro de un año de edad injertadas en el portainjerto 'Garnem' mostraron síntomas graves, como defoliación, marchitez y muerte regresiva, y algunas plantas murieron cuando se inocularon con *Pp. vexans* y *Ph. niederhauserii*. Algunos aislados de *Ph. niederhauserii* redujeron significativamente el peso seco de las raíces en comparación con el control, pero este efecto no se observó en plantas inoculadas con *Pp. vexans*.

La última sección experimental de esta tesis tuvo como objetivo evaluar la patogenicidad de 12 especies de oomicetos presentes en el suelo. (incluidos *Globisporangium*, *Phytophthora* y *Phytophthium*) en tres portainjertos híbridos de *Prunus* utilizados frecuentemente ('Garnem', 'GF-677' y 'Rootpac-40') en la cuenca mediterránea. Se realizaron pruebas de patogenicidad con 15 aislados de oomicetos en plantas de portainjertos de 1 año de edad. Noventa días después de la inoculación se evaluaron los síntomas de la enfermedad con una escala de severidad y se calculó el Área Bajo la Curva de Progresión de la Enfermedad y la probabilidad de supervivencia de las plantas inoculadas. Todos los aislados fueron patógenos para las plántulas de los portainjertos y se volvieron a aislar de las lesiones de las raíces. Para cada portainjerto se detectaron grandes diferencias en virulencia entre las diferentes especies de oomicetos y aislados de *Ph. niederhauserii*. *Phytophthora multivora* y *Pp. helicoides* fueron generalmente los más virulentos. Estos hallazgos mejoran el conocimiento sobre la patogenicidad de especies de oomicetos aisladas frecuentemente en plantaciones de *Prunus* spp. y revelan los riesgos potenciales para este cultivo.



El nuevo Doctor Francisco Beluzán Flores, los miembros del tribunal y directores después de la defensa de la tesis. De izquierda a derecha: Paloma Abad Campos (directora), Soledad Martos

Arias (vocal), Mónica Berbegal Martínez (secretaria), Francisco Beluzán Flores (doctorando), Josep Armengol Fortí (director) y Antonieta De Cal y Cortina (presidenta).

Publicaciones derivadas de la Tesis:

BELUZÁN, F., ARMENGOL, J. and ABAD-CAMPOS, P. (2023). Pathogenicity of Oomycete Species to Different *Prunus* Hybrid Rootstocks. *Plant Disease*, 107(5), 1499-1509.

BELUZÁN, F., MIARNAU, X., TORGUET, L., ARMENGOL, J. and ABAD-CAMPOS, P. (2022). Survey of oomycetes associated with root and crown rot of almond in Spain and pathogenicity of *Phytophthora niederhauserii* and *Phytophthora vexans* to 'Garnem' rootstock. *Agriculture*, 12(2), 294.

BELUZÁN, F., MIARNAU, X., TORGUET, L., ZAZURCA, L., ABAD-CAMPOS, P., LUQUE, J. and ARMENGOL, J. (2022). Susceptibility of almond (*Prunus dulcis*) cultivars to twig canker and shoot blight caused by *Diaporthe amygdali*. *Plant Disease*, 106(7), 1890-1897.

BELUZÁN, F., OLMO, D., LEÓN, M., ABAD-CAMPOS, P. and ARMENGOL, J. (2021). First report of *Diaporthe amygdali* associated with twig canker and shoot blight of nectarine in Spain. *Plant Disease*, 105(10), 3300.

BELUZÁN, F., VICENT, A., CONESA, D., TORRENTÍ, F., OLMO, D., LEÓN, M., ABAD-CAMPOS, P. and ARMENGOL, J. (2024). Effect of weather variables on the inoculum dispersal of *Diaporthe amygdali*, causal agent of twig canker and shoot blight of almonds. Enviado a *Phytopathology*.