

**EPS**Escola Politècnica
Superior

Projecte/Treball Fi de Carrera

Estudi: Eng. Tècn. Agrícola Explotacions Agropec. Pla 99

Títol: Simptomatologia i microorganismes associats a la necrosi
bruna apical de la noguera (*Juglans regia*)

Document: Memòria

Alumne: Teresa Madrid Portis

Director/Tutor: Dra. Concepció Moragrega
Departament: Eng. Química, Agrària i Tecn. Agroalimentària
Àrea: Producció Vegetal

Convocatòria (mes/any): Setembre 2009



Simptomatologia i microorganismes associats a la necrosi bruna apical de la noguera (*Juglans regia*)

Treball Final de Carrera

**Enginyeria Tècnica Agrícola
Especialitat Explotacions Agropecuàries**

Treball dirigit per la Dra. Concepció Moragrega

Teresa Madrid Portis

Setembre 2009

ÍNDEX

Resum	1
Agraïments	3
Introducció	4
1. El cultiu de la noguera	4
2. Malalties què afecten el conreu de la noguera	7
2.1. Antracnosi	7
2.2. Bacteriosi	7
3. La necrosi apical bruna	8
Objectius	10
Materials i mètodes	11
1. Avaluació de la malaltia a camp	11
2. Descripció i seguiment dels símptomes	11
3. Aïllament i identificació de microorganismes associats a la BAN	13
a. Aïllament de fongs	13
b. Aïllament de bacteris	14
4. Patogenicitat dels microorganismes aïllats	14
Resultats	16
1. Avaluació de la malaltia camp	16
2. Descripció i seguiment dels símptomes	17
3. Aïllament i identificació dels microorganismes associats a la BAN	21
4. Patogenicitat dels microorganismes aïllats	28
Discussió	31
Conclusions	35
Bibliografia	36

RESUM

La Necrosi Apical Bruna (BAN, brown apical necrosis, segons les sigles en anglès) Es va detectar per primer cop l'any 1997 a Extremadura degut a la severa caiguda de fruits. Avui dia la malaltia és present a quasi totes les zones productores de la mediterrània. Els símptomes difereixen dels provocats per *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* i *Gnomonia leptostyla*.. S'observa que els fruits afectats presenten una taca bruna a la zona apical i necrosi dels teixits interiors. El grup de Patologia Vegetal de la Universitat de Girona participa i dirigeix la tasca sobre l'etiologia de la BAN dins la xarxa europea d'investigació en bacteris patògens de fruiters ,COST873. Hi ha una certa controvèrsia en la definició dels símptomes i agents causals. Tots els grups coincideixen en afirmar que es tracta d'una malaltia complexa amb diferents organismes implicats. En aquest context es desenvolupa el present treball.

Durant l'any 2008 es va realitzar el seguiment de la malaltia sobre tres varietats de noguera (Hartley Chandler i Franquette) amb l'objectiu de caracteritzar els símptomes, estudiar l'evolució de la malaltia durant el cicle productiu, identificar de l'agent o agents causals i el paper que cadascun juga en el desenvolupament de la malaltia.

Es va mesurar la incidència de la malaltia sobre dos arbres de cada varietat amb la finalitat d'obtenir les corbes de progrés de la malaltia. Alhora es van recollir mostres representatives dels diferents nivells observats d'evolució de la malaltia pel seguiment dels símptomes externs i interns. Es van escollir els fruits amb clars símptomes de necrosi bruna per l'aïllament dels microorganismes presents a les lesions realitzant extraccions diferenciades de cada teixit necrosat (mesocarpi, endocarpi i llavor) sobre medis específics pel creixement de fongs i bacteris. Posteriorment es va avaluar la patogenicitat en noguera de representants dels diferents gèneres de microorganismes aïllats sobre fruits immadurs (Gf+30) de la varietat Chandler.

Els resultats van mostrar un progrés similar de la malaltia en les tres varietats, amb un període de màxim increment de la incidència des de quallat del fruit fins a Gf+20-30. En quant al seguiment de la simptomatologia exteriorment es van observar necrosis circulars i seques a la zona apical dels fruits, inicialment de color bru amb un to vermell evolucionant cap a tons mes foscos. Es va poder observar l'evolució i progrés de la necrosi des dels teixits exteriors cap als interiors. Els microorganismes aïllats van

correspondre al bacteri *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* i als fongs *Fusarium* sp. i *Alternaria* sp. La identificació dels aïllats de *Fusarium* es va fer a nivell d'espècie, l'aïllada amb major freqüència va ser *F. chlamidosporum* (25,8%) seguida de *F. lateritium* (16%). *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* va ser el microorganisme aïllat amb major freqüència i consistentment en tots els teixits. *Fusarium* sp. es va aïllar amb baixa freqüència en tots els teixits mentre *Alternaria* sp. nomès es va aïllar en teixits exteriors. Pel que fa a la patogenicitat els aïllats de *X.a* pv. *juglandis* i *Fusarium* sp. van provocar símptomes similars als de la BAN sobre els fruits inoculats. Es va observar que les necrosis provocades pels fongs inoculats eren en general més superficials que les provocades per *X. a* pv. *juglandis*.

Chandler es va mostra més sensible a la BAN que la varietat Hartley. En el cas de la varietat Franquette, més tardana, aquesta es va mostrar la sensibilitat més baixa. Els símptomes de la BAN es van diferenciar dels provocats per *X. a* pv *juglandis* en el color i consistència de les lesions. Es van observar a lesions necròtiques a la zona apical, de geometria circular, color bru- vermellós i aparença exterior seca. Aquestes afectaven sobretot fruits en desenvolupament des de quallat fins a Gf+30-45 període en què es donen les condicions favorables per a que els microorganismes implicats produeixin les infeccions. En quant als microorganismes implicats es pot afirmar que *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* està relacionat amb l'aparició d'aquesta. *Fusarium* sp. i *Alternaria* sp. actuen com a colonitzadors oportunistes sent possible que afavoreixin o intensifiquin el desenvolupament dels símptomes característics de la BAN. En els assajos de patogenicitat *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, ha mostrat ser el microorganisme més virulent i el que més s'han apropiat a la reproducció dels símptomes de BAN. Entre els fongs, *Fusarium* sp. ha mostrat una capacitat patogènica i de reproducció dels símptomes de BAN major que *Alternaria* sp.

Paraules clau:

Noguera, BAN(brown apical necrosis), Bacteriosi, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp.

AGRAIMENTS

Molt especialment a la Dra. Concepció Moragrega García per donar-me la oportunitat de treballar en els seus projectes, per la seva confiança i predisposició.

Al Dr. Emili Montesinos, com a coordinador de la secció de Patologia vegetal de l'institut de Tecnologia Agroalimentària de l'Universitat de Girona per permetre'm formar part de l'equip.

A l'IRTA Mas de Bover i especialment a en Josep Matias, per la seva col·laboració en la presa de mostres, en l'avaluació de la malaltia a camp, i per tota la informació facilitada.

A la secció de PaVé de l'INRA Angers, per la col·laboració en la identificació molecular dels aïllats de *Xanthomonas arboricora* pv. *juglandis*.

A la Esther Badosa, Lúdia Ruz, Anna Bonaterra, Jordi Cabrefiga, Jesus Francés, Olga Montojo, Josep Pareda i a tot el personal de l'INTEA, investigadors i col·laboradors, per la seva voluntat pedagògica, per l'ajuda i consell que sempre han estat disposats a oferir-me i pel bon ambient de treball del que he gaudit treballant al seu costat.

A la Gemma Santamaria, Pere Vilardell, Mireia Puig, Pedro Loshuertos, Enric Agustí, Raquel Giménez i a tots els becaris per la seva ajuda i consell a l'hora de resoldre dubtes i per l'energia i il·lusió que m'han transmès.

A tothom qui m'acompanya i a qui em va acompanyar, família i amics, per confiar en mi i donar-me esma.

INTRODUCCIÓ

1. El cultiu de la noguera

La noguera europea (*Juglans regia*) es originaria de les zones muntanyoses de l'Àsia central. Es creu que va ser introduïda a occident durant la prehistòria recent, a partir de l'entrada en contacte amb fenicis i grecs, no obstant es pot seguir el seu rastre a la península ibèrica al llarg del període quaternari (Burjachs i Casas, 2006). Es tracta d'un arbre caducifoli de port elegant, pot arribar als 20 metres d'alçada. L'escorça és llisa, en ocasions escarada, de color gris clar. Les fulles són verdes al principi pubescents formades per entre 5 i 9 fol·líols ovalats. Floreix en començar la brotada a l'inici de la primavera. Les flors masculines naixen sobre les branques de l'any anterior, són nombroses i s'agrupen en aments cilíndrics penjants. Les flors femenines apareixen a l'àpex de les branques de l'any en grups d'entre 1 i 5 suportades per un peduncle curt i gruixut; l'ovari és ínfer amb un òvul, coronat pel calze, dividit en 3-4 lòbuls i acabat amb dos estils curts i corbats. El fruit és una drupa, amb mesocarpí carnós i endocarp dur, arrugat en dos valves i dividit incompletament en quatre cel·les; la llavor és comestible, arrugada amb quatre lòbuls (Infoagro, 2009).

El seu conreu és important econòmicament tant per la producció de fruit com de fusta; les polítiques de difusió de les propietats beneficioses de la nou han fet augmentar el seu consum. Aquest fet junt amb la modernització de les explotacions i la millora en les tècniques de recol·lecció i processat han fet augmentar la seva rendibilitat, es tracta d'un conreu amb bones perspectives econòmiques. Al mercat trobem varietats americanes (Serr, Chandler, Hartley, Vina, Tehama, Swar, Payne, Pioneer, Chico, Amigo i Pedro), espanyoles (Baldo II, Carcagente, Cerda, Escriva y Villena) i franceses (Fernor, Franquette, Grandjean, Marbot, Corne, Mayette, Parisienne, Chaberte, Candelou, Meylannaise, Ronde de Montignac) (Infoagro, 2009)

La nou ocupa el segon lloc en quant a volum mundial de producció en el sector dels fruits secs darrera l'avellana i seguida de l'ametlla. La producció s'estén als dos hemisferis, entre 30 i 50 graus de latitud Nord i entre els 30 i 40 al Sud. A nivell mundial el principal productor es la República Popular Xinesa amb una producció estimada de 490.000 tm per la campanya 2008/09. La segueixen els EEUU amb 340.000tm. Aquest dos països són junt amb Mèxic els principals exportadors mundials.

La unió europea (UE-27) ocupa la cinquena posició mundial amb una producció de 44.500 tm tot i això la demanda interna fa que sigui el primer en quant a volum d'importació(USDA, 2008).

A l'estat espanyol el 2007 es van produir 9.512 tm, amb un valor de quasi 21.000 milers d'euros (MARM, 2008). L'exploració del conreu s'ha anat professionalitzant els últims anys, la superfície en plantació regular ha augmentat considerablement, el 1996 es comptabilitzaven 2.300 ha que s'havien doblat en arribar al 2006. En quant als arbres disseminats, el seu nombre s'ha reduït a la meitat en el mateix període. Tot i això Espanya continua sent un país netament importador (taula 1).

Taula 1. Evolució de la superfície de noguera, arbres disseminats, rendiment, producció, preu, valor i comerç exterior a l'estat espanyol (MARM, 2008).

Anys	Superfície en plantació regular		Arbres disseminats milers d'arbres	Rendiment de la superfície en producció (qm/ha)	Producció (tones)	Valor (milers d'euros)	Comerç exterior ⁽¹⁾ (tones)	
	Total (hectàrees)	En producció (hectàrees)					Importacions	Exportacions
1990	2.497	1.882	470	43,0	8.091	11.641	18.968	220
1991	2.708	2.163	478	41,5	8.967	15.490	17.165	251
1992	2.298	1.747	484	51,9	9.046	13.974	16.848	122
1993	2.789	2.322	511	37,5	8.717	14.362	16.066	114
1994	2.775	2.271	457	32,4	8.282	13.448	18.512	181
1995	2.874	2.307	498	35,1	8.110	13.744	19.709	178
1996	2.996	2.307	473	14,9	10.059	14.906	21.265	221
1997	2.985	2.259	498	15,6	9.503	14.255	20.021	541
1998	2.905	2.397	444	12,3	7.713	13.126	20.678	811
1999	3.130	2.551	452	16,4	9.960	16.988	26.313	1.268
2000	4.065	3.349	439	14,9	11.418	21.876	31.535	1.260
2001	4.287	3.446	417	16,4	11.903	20.456	33.638	1.653
2002	5.333	3.341	418	20,0	13.657	28.209	41.082	1.514
2003	5.515	3.525	279	19,7	9.418	17.253	34.402	2.114
2004	5.978	5.071	254	16,8	8.514	15.597	26.240	1.013
2005	5.846	5.092	251	16,9	8.629	16.588	25.236	1.621
2006	6.134	4.875	232	20,8	10.140	21.082	23.487	1.324
2007	7.147	5.650	217	16,8	9.512	20.930	23.443	1.985

⁽¹⁾ En equivalent amb pela, sent la relació de conversió a nou pelada de 3,30.

La Comunitat Valenciana, Catalunya i Extremadura són les comunitats autònomes on s'han establert més plantacions de noguera de tipus fructícola en règim de secà o regadiu. La producció de cadascuna d'elles ronda les 1300- 1500 tones (taula 2).

Taula 2. Anàlisi per comunitats autònomes de superfície de noguera, arbres disseminats, i producció de nou l'any 2007 (MARM, 2008).

Comunitats Autònomes	Superfície en plantació regular (hectàrees)					Arbres disseminats (n°)	Producció amb pela (tones)
	Total			En producció			
	Secà	Regadiu	Total	Secà	Regadiu		
GALICIA	305	66	371	305	66	10.918	714
P. DE ASTURIAS	-	-	-	-	-	30.000	45
CANTABRIA	7	-	7	7	-	7300	80
EUSKADI	122	-	122	115	-	59.835	596
NAVARRA	190	60	250	170	55	11.200	294
LA RIOJA	174	141	315	108	103	-	167
ARAGÓN	81	150	231	64	120	-	823
CATALUNYA	219	623	842	164	470	2.440	1.427
BALEARS	5	1	6	5	-	3.000	31
CASTILLA Y LEÓN	139	27	166	124	23	28.403	490
MADRID	-	3	3	-	3	2.279	15
CASTILLA-LA MANCHA	286	309	595	286	243	25.807	780
C. VALENCIANA	964	1.228	2.192	807	1.026	5.000	1.501
R. DE MURCIA	165	45	210	130	30	684	285
EXTREMADURA	-	645	645	-	480	200	1.346
ANDALUCÍA	530	653	1.183	255	485	16.647	895
CANARIAS	1	8	9	1	5	12.810	23
ESPANYA	3.188	3.959	7.147	2.541	3.109	216.523	9.512

Pel que fa a Catalunya la producció es va quasi quadruplicar entre el 1996 i el 2007, les plantacions establertes els últims anys, majoritàriament de regadiu estan entrant en producció. Aquestes es concentren sobretot a les províncies de Tarragona i Girona (Taula 3).

Taula 3. Anàlisi provincial a Catalunya de superfície de conreu de noguera, arbres disseminats, i producció l'any 2007 (MARM, 2008).

Províncies i Comunitats Autònomes	Superfície en plantació regular (hectàrees)					Arbres disseminats (número)	Rendiment			Producció amb pela (tones)
	Total			En producció			Superfície en producció (kg/ha)		Arbres disseminats (kg/arbre)	
	Secà	Regadiu	Total	Secà	Regadiu		Secà	Regadiu		
Barcelona	40	17	57	38	16	1.439	3.000	4.000	8	190
Girona	35	193	228	35	165	-	1.000	2.506	-	448
Lleida	66	218	284	13	101	1.001	923	2.505	14	279
Tarragona	78	195	273	78	188	-	679	2.431	-	576
Catalunya 2007	219	623	842	164	470	2.440	1.305	2.527	10	1.427
Catalunya 1996	151	155	306	73	140	7.347	959	1607	12	385

2. Malalties què afecten el conreu de la noguera

Entre les malalties que provoquen reduccions significatives de producció destaquen les que es manifesten amb necrosis de fruit i fulla, es tracta de malalties d'origen bacterià i criptogàmic. Entre les rigorosament descrites destaquen:

2.1- Antracnosi.

Provocada pel fong *Gnomonia leptostyla* (asexual: *Marssoniella juglandis*). S'estén a totes les àrees de conreu, la incidència varia segons l'any i la regió. Provoca lesions en tots els òrgans verds: fulles, pecíols, brots joves i fruits; apareixen lesions de forma rodona i color bru-negre. Atacs severos provoquen la caiguda prematura de fulles per senescència i l'assecat dels fruits. *Gnomonia leptostyla* hiverna sobre fulles mortes en les què forma periteques. Les ascòspores alliberades a la primavera causen la infecció primària i els conidis formats sobre les lesions estenen la malaltia durant tota l'estació. Temperatures al voltant dels 21 °C junt amb humitats elevades (96-100%) afavoreixen la infecció (Smith, 1992).

Pel control es recomanen tractaments fungicides en el moment de descarrega d'ascòspores (Smith, 1992) i pràctiques culturals per eliminar la font d'inòcul, destrucció de fulles caigudes, poda de brots i branques afectades i bon control de la fertilització amb nitrogen (Berry, 1977).

2.2- Bacteriosi.

Causada pel bacteri *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Afecta a tots els teixits verds. Es manifesta sobre brots i fulles amb l'aparició de taques vermelloses què evolucionen a necrosis negres totals en cas de teixits joves. Sobre les fulles s'observen lesions irregulars de pocs mil·límetres. Els aments afectats poden presentar lesions negres i deformacions en el creixement. En quant a les flors femenines la infecció es produeix a través del pistil i provoca necrosis terminals i la caiguda. Els fruits desenvolupen lesions negres enfonsades sobre tota la superfície què en infeccions primerenques evolucionen cap als teixits interiors fins la llavor (Adaskaveg i col, 2007)

El bacteri hiverna a l'interior de borrons i aments, s'estén als brots en creixement, sembla ser que el pol·len infectat el transporta cap a les flors. Les condicions d'elevada

precipitació i temperatures de suaus a elevades afavoreixen el desenvolupament de la malaltia (Aletà i col., 2001).

El control s'aconsegueix amb l'aplicació de tractaments preventius a l'inici de la primavera repetits després de la floració, el nombre de tractament necessaris depèn de les condicions meteorològiques (Adaskaveg i col, 2008). El desenvolupament de models de predicció adaptats a cada regió permet minimitzar el nombre de tractaments necessaris. Actualment es troba implementat el model XanthoCast per la regió de Califòrnia (James i Adaskaveg, 2007).

3. La necrosi apical bruna

En els últims anys, una nova malaltia, la Necrosi Apical Bruna (BAN, Brown Apical Necrosis segons les sigles en anglès) ha adquirit importància. Es va detectar per primer cop l'any 1997 a Extremadura i l'any següent a Itàlia degut a la severa caiguda de fruits. Avui dia la malaltia és present a totes les zones productores de la mediterrània, amb excepció de França, on des del 1999 no s'ha tornat a observar.

Els símptomes difereixen dels provocats per *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (figura1) i *Gnomonia leptostyla*. S'observa que els fruits afectats presenten una taca bruna a la zona apical i necrosi dels teixits interiors.



Figura 1. Diferència entre la Necrosi Apical provocada per *X. a* pv. *juglandis* en fruits de noguera (esquerra) i la Necrosi Apical Bruna (dreta).

Entre el 1999 i el 2000 grups italo-francesos van estudiar la malaltia a partir de fruits recol·lectats a Itàlia i França. El 2000 es va traslladar la investigació a camp per tal de clarificar l'etiologia. A partir dels fruits simptomàtics es van aïllar diverses

especies dels fongs *Alternaria*, *Fusarium* i *Colletotrichum*, diferents segons la localitat. Tot i aïllar soques de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en el 10% dels fruits afectats, es va considerar que aquestes provenien d'infeccions independents i simultànies. Després de realitzar assaigs de patogenicitat sobre fruits sans, *Fusarium* sp. es va presentar com l'agent primari causant de la malaltia (Belisario i col, 2002). El mateix estudi recomana el desenvolupament de nous projectes per tal de determinar la capacitat patogènica dels fongs associats i per separar els agents primaris dels colonitzadors secundaris.

Amb l'objectiu de posar en comú els coneixements sobre la malaltia i a fi d'elaborar un document tècnic a disposició dels productors, es va crear el grup de treball sobre la BAN dins la xarxa europea d'investigació en bacteris patògens de fruiters COST873. Les primeres discussions sobre resultats es desenvoluparen el 2007 a Angers. Sense haver arribat a conclusions compartides, es va proposar una nova trobada el 2008 a Turquia. L'objectiu de la reunió es va focalitzar en observar i discutir la simptomatologia del BAN per tal de diferenciar-la d'altres tipus de necrosis i intentar elaborar conjuntament un full informatiu sobre la malaltia (COST873, 2008).

La controvèrsia en la definició dels símptomes i agents causals continua. Tots els grups coincideixen en afirmar que es tracta d'una malaltia complexa amb diferents organismes implicats, sense aconseguir arribar a conclusions compartides sobre el paper que juga cadascú.

El grup de Patologia Vegetal de la Universitat de Girona participa i dirigeix la tasca sobre l'etiologia de la BAN dins el COST873. En aquest context es desenvolupa el present treball.

OBJECTIUS

Els objectius generals que es proposen són la caracterització dels símptomes, l'estudi de l'evolució de la necrosi apical bruna durant el cicle productiu, la identificació de l'agent o agents causals i el paper que cadascun juga en el desenvolupament de la malaltia. Per això s'han proposat els següents objectius específics:

1. Conèixer el progrés de la malaltia a camp
2. Definir els símptomes característics de la malaltia en fruits de noguera i la seva evolució en el temps
3. Aïllar i identificar els microorganismes associats a les infeccions i avaluar la seva patogenicitat en fruits de noguera

Es pretén facilitar la identificació de la malaltia evitant controvèrsia. El coneixement de l'agent causal i de l'epidemiologia de la necrosi apical bruna ha de permetre dissenyar estratègies de control específiques per a la malaltia.

MATERIALS I MÈTODES

Entre el maig i l'agost del 2008 es va realitzar el seguiment del progrés de la malaltia, l'observació de la simptomatologia junt amb la seva evolució, i la determinació dels microorganismes associats a les lesions en una finca comercial dedicada a la producció de nou situada a Cornudella de Montsant (comarca del Priorat, Tarragona, NE d'Espanya). L'estudi es va realitzar sobre tres varietats, Hartley, Chandler i Franquette a la mateixa finca. Durant el temps que va durar a l'estudi es van evitar les aplicacions de tractaments cúprics i fungicides per tal d'avaluar el progrés de la malaltia en condicions naturals.

1. Avaluació de la malaltia a camp

Es va mesurar la incidència de la malaltia sobre dos arbres de cada varietat (Hartley Chandler i Franquette) amb una periodicitat setmanal des de finals de maig fins a finals de juliol i una vegada més a finals d'agost. Es va seguir l'evolució de la malaltia a partir de 100 fruits de cada arbre, 25 de cada orientació (N, S, E i O). Es va expressar la incidència com el percentatge de fruits amb clars símptomes de BAN (necrosi apical bruna) del total de 25 marcats en cada orientació. A partir dels valors d'incidència es va calcular la mitjana per data i varietat amb la finalitat d'obtenir les corbes de progrés de la malaltia. Es va realitzar l'anàlisi de la variància i el test de separació de mitjanes de Tukey pels valors finals de malaltia a camp en les tres varietats. La homogeneïtat de les variances es va comprovar amb la prova de Barlett i la homogeneïtat dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk. Els càlculs es van realitzar amb el procediment GLM del paquet d'aplicacions estadístiques SAS (SAS Institute, Cary, NC,USA).

2. Descripció i seguiment dels símptomes

En la mateixa finca on es va realitzar l'avaluació de la malaltia es van recollir fruits de les tres varietats de noguera (Hartley, Chandler i Franquette) amb una periodicitat setmanal, des del moment de quallat del fruit (estadi de desenvolupament Gf) a finals de maig en el cas de les varietats Hartley i Chandler i fins a principis d'agost (estadi Gf+60 o superior). Es va procurar escollir una mostra representativa dels diferents nivells

observats d'evolució de la malaltia (fruits sans, amb necrosi incipient, marcada, amb halos necròtic, etc). S'agafaven fruits aproximadament 20 fruits per varietat i tipus de lesió d'arbres situats en dos zones diferents de la parcel·la. Es van prendre els que presentaven símptomes clars de necrosi apical bruna (BAN,) menyspreant aquells que patien necrosi negra localitzada a la zona apical (AN), típica de bacteriosi causada per *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*.

Els fruits es conservaven empaquetats individualment en paper d'alumini en cambra freda (4°C) fins el moment d'enviar-los al laboratori. Es va procurar mantenir la cadena de fred per tal d'evitar l'evolució dels símptomes fins el moment de l'anàlisi. Es rebien les mostres a l'EPS de la Universitat de Girona al cap de 24 hores d'haver recollit els fruits a través d'una empresa de missatgeria i es mantenien a 4°C fins el moment de les anàlisis.

Un cop a laboratori s'observaven i anotaven els símptomes externs dels fruits i es feia una classificació dels fruits en funció d'aquests. Es van triar entre 5 i 15 fruits de cada data, varietat, localització i tipus de símptoma per l'anàlisi de l'evolució interna de les infeccions i per l'aïllament dels organismes associats a les necrosi. En l'observació dels símptomes interns s'anotava l'abast intern de la necrosi, els teixits (mesocarp, endocarp, llavor), (figura 2) i zones afectades.

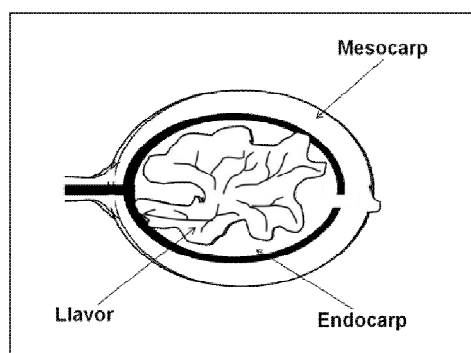


Figura 2. Fruit de noguera esquematitzat amb la diferenciació de teixits

A partir de les dades de teixits necrosats per cada fruit, data i varietat es van calcular les freqüències de teixits afectats. Es van fer grups aleatoris de 3-5 fruits considerats

com a repeticions per cada data i varietat. Amb aquests valors es va realitzar l'anàlisi de la variança per analitzar l'efecte de la data i la varietat en els teixits afectats. La homogeneïtat de les variàncies es va comprovar amb la prova de Barlett i la homogeneïtat dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk. Es va utilitzar el procediment GLM del paquet d'aplicacions estadístiques del SAS (SAS Institute, Cary, NC,USA).

3. Aïllament i identificació de microorganismes associats a la BAN

Es van escollir els fruits amb clars símptomes de necrosi bruna per procedir a l'aïllament dels microorganismes presents a les lesions. Prèviament es van desinfectar per immersió durant un minut en solució d'hipoclorit de sodi al 1% ; després de tres rentats en aigua destil·lada estèril es van deixar assecar sobre paper de filtre estèril dins la campana de flux laminar.

Es van realitzar extraccions diferenciades de cada teixit necrosat (mesocarpi, endocarpi i llavor) sobre medis específics pel creixement de fongs i bacteris. No es van realitzar aïllaments de l'epicarp per haver estat desinfectat, aquest es retirava amb un bisturí estèril. Es començava realitzant extracció del teixit més exterior (mesocarpi), posteriorment es partia el fruit per la meitat per observar l'abast de la lesió i realitzar aïllaments dels teixits interns (endocarp i llavor).

a. Aïllament de Fongs

En el cas de l'aïllament de fongs es van prendre amb un bisturí estèril, dos fragments de teixit del marge de la lesió agafant part de teixit sa i es van dipositar en una placa amb medi PDA (potato-dextrose agar) (Atlas i col., 1996). Els cultius es van incubar a 22,5°C (MIR- 253. SANYO, Japó) amb 16 hores de llum durant 5 dies. Cultius purs dels diferents aïllats obtinguts es van conservar a 4°C en tubs de PDA inclinat per a la posterior caracterització morfològica.

La identificació es va realitzar a partir de característiques culturals i observacions al microscopi. En el cas *Fusarium* es va procedir a la determinació a nivell d'espècie seguint un mètode basat en l'observació de les característiques culturals (colors, velocitat de creixement) sobre medi PDA i d'estructures al microscopi formades sobre medi de CLA (carnation leave agar), (Nelson i col., 1997).

b. Aïllament de bacteris

Per l'aïllament de bacteris es van realitzar dilacerats de fragments de teixit infectat, també del marge de la lesió, en 50 µL d'aigua destil·lada estèril, després d'uns minuts es sembraven en estria sobre plaques amb medi LB (Luria-Betani) (Maniatis i col., 1982), YDC (yeast dextrose agar) (Shaad, 2001) específic per afavorir la formació del mucíl·lag característic de *Xanthomonas* i sobre TMM (tween modified medium) (Shaad, 2001), medi semiselectiu per *X. arboricola* pv. *juglandis*. Les plaques es van incubar a 27 °C durant 5 dies (MLR-350. SANYO, Japó), les colònies amb morfologia diferent es van reaïllar i conservar a 4 °C en tubs de medi de LB o YDC inclinat.

Els aïllats amb característiques *Xanthomonas* spp. sobre medi de YDC o TMM es van identificar mitjançant proves morfològiques i moleculars (Gironde i Manceau, 2009). Com a control positiu es van utilitzar les soques de *X. a* pv. *juglandis* CFBP 2528 i 2763 (Angers, França). Les soques identificades com *X. arboricola* pv. *juglandis* van ser congelades a -80 °C en solució de glicerol al 15%.

Es va calcular el percentatge de microorganismes diferents aïllats en cada teixit per varietat i data. Es van calcular les mitjanes considerant tres grups de 3-5 fruits per varietat i data. Amb aquests valors es va realitzar l'anàlisi de la variança per determinar l'efecte del teixit i la varietat en els microorganismes aïllats. La homogeneïtat de les variances es va comprovar amb la prova de Barlett i la homogeneïtat dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk. Es van utilitzar el procediment GLM del paquet d'aplicacions estadístiques SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA).

4. Patogenicitat dels microorganismes aïllats

Es va avaluar la patogenicitat en noguera de representants de diferents gèneres de microorganismes aïllats. L'assaig es va realitzar sobre fruits immadurs (Gf+30) de la varietat Chandler. Així, es van seleccionar 13 soques representatives dels fongs aïllats, 6 del gènere *Fusarium*, 7 d'*Alternaria*, i 7 soques de *X. arboricola* pv. *juglandis* per l'assaig de patogenicitat.

Es van inocular separatament sobre fruits joves de la varietat Chandler recollits a l'estadi de Gf+30 en una finca comercial a Tarragona en la què s'havien evitat els tractaments químics. En tots els casos es van inocular tres repeticions de tres fruits amb

cada aïllat. Abans de la inoculació es va procedir a la desinfecció dels fruits per immersió durant 2 minuts en solució d'hipoclorit de sodi al 1% seguida de tres rentats en aigua destil·lada estèril i l'assecat sobre paper de filtre estèril dins la campana de flux laminar.

L' inòcul dels fongs *Fusarium* sp. i *Alternaria* sp. es va obtenir a partir de cultius de 7 dies crescuts a 22,5 °C i 16 hores de llum sobre PDA. Es van inocular posant en contacte un fragment de miceli d' aproximadament 3 mm de costat sobre l'extrem de l'estigma desproveït de l'epicarp i dos fragments més en la zona apical lateral. Com a control es va dipositar sobre les ferides un fragment de medi PDA estèril.

El bacteri *X. arboricola* pv. *juglandis* es va inocular mitjançant punxada, a la zona de l'estigma, amb una agulla estèril sucada en una colònia d'un cultiu de 7 dies crescut en medi de YDC. Es van practicar tres punxades a cada fruit, al voltant de la zona apical. Com a control es van punxar els fruits amb aigua destil·lada estèril.

Els fruits inoculats es van incubar en cambra humida sobre paper de filtre humitejat amb aigua destil·lada estèril dins safates de plàstic de 25x50 cm. Les safates es van precintat a l'interior de bosses de plàstic transparent per mantenir la humitat evitant la deshidratació dels fruits i afavorint el desenvolupament de la infecció. Es distribuïen els fruits aleatòriament, col·locant les tres repeticions de cinc fruits per repetició en safates diferents. Aquestes es van distribuir aleatòriament dins la cambra d'incubació.

Es van incubar els fruits inoculats durant 7-9 dies en cambra d'ambient controlat a 25 °C amb 16 hores de llum (MLR-350. SANYO, Japó) a la fi dels quals es va procedir a l'observació i registre dels resultats. Es van seccionar els fruits per la zona apical per anotar els símptomes (color i consistència) i l'avenç intern de la infecció. Es va determinar la capacitat patogènica de les soques inoculades com la capacitat d'evolució cap als teixits interiors i la virulència en funció de l'abast de la necrosi.

En cas d'alguns fruits seleccionats, es va reaïllar el microorganisme present a les infeccions de la mateixa manera que en l'aïllament de fruits.

RESULTATS

1. Avaluació de la malaltia camp

Es va avaluar la incidència de la malaltia, expressada com el percentatge de fruits amb símptomes de BAN, sobre dos arbres de cada varietat (Hartley, Chandler, Franquette) des de finals de maig, coincidint amb el moment de quallat del fruit i fins a finals d'agost; en el cas de la varietat Franquette el quallat es va produir aproximadament un més després (20 de juny) que en les varietats Chandler i Franquette (22 de maig). A partir dels valors mitjans d'incidència es va representar la corba de progrés de la malaltia per a cada varietat.

A la figura 3 s'observa un progrés similar de la malaltia en les tres varietats, amb un període de màxim increment de la incidència des de quallat del fruit fins a Gf+30 aproximadament en el cas de Chandler i Hartley i fins a Gf + 5 en el cas de Franquette. Aquest període es correspondria amb el de màxima sensibilitat dels fruits a la BAN i en el que s'observa una important caiguda prematura dels fruits. Es pot observar que a partir de l'estadi Gf+20/30 la incidència de la malaltia va augmentar suaument, mantenint pràcticament els mateixos nivells fins a finals d'agost.

Tot i presentar corbes de progrés de la malaltia similars, la varietat Chandler es va mostrar més sensible a la BAN que la varietat Hartley, amb valors de incidència significativament superiors. La incidència final en la varietat Chandler va arribar al 42% de fruits afectats enfront del 25% en la varietat Hartley. En el cas de la varietat Franquette, més tardana, els valors d'incidència es van mantenir, fins a finals d'agost, al voltant del 10-15 % de fruits afectats. Aquesta es va mostrar menys sensible a la BAN que les varietats Hartley i Chandler.

Es va realitzar l'anàlisi de la variància i el test de separació de mitjanes pels valors finals de malaltia a camp en les tres varietats. L'ANOVA va mostrar un efecte significatiu de la varietat en la incidència de la malaltia al final del període ((P>F)=0,0015, R²= 0,94). La prova de separació de mitjanes de Tukey va indicar que els nivells d'incidència finals eren significativament diferents en les tres varietats (Figura 3).

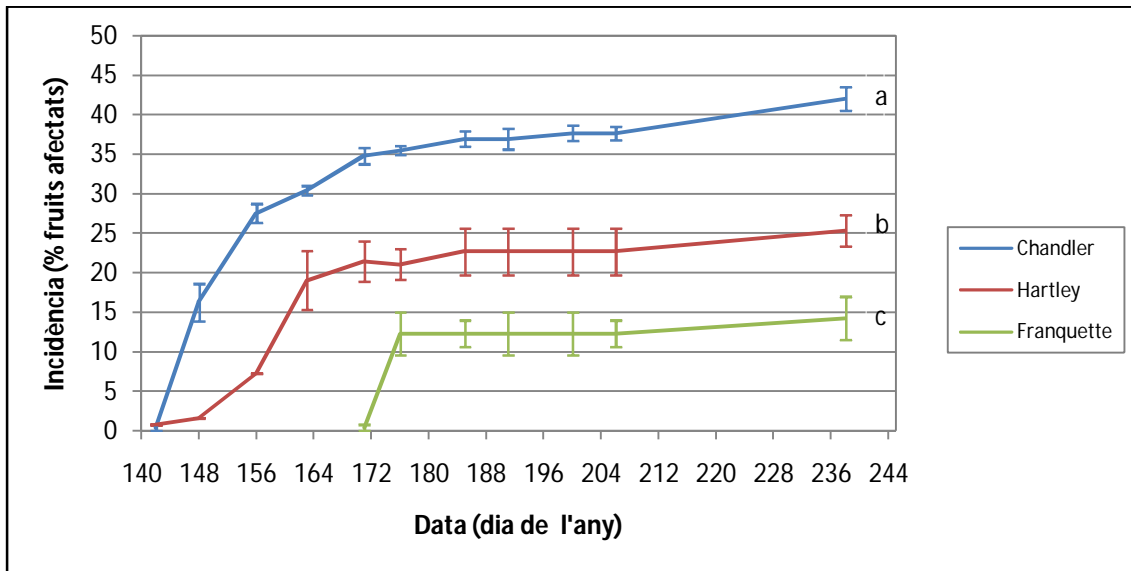


Figura 3. Evolució de la necrosi apical bruna (BAN) en fruits de noguera d'arbres de tres varietats. Els valors corresponen a la mitjana de 2 arbres i 100 fruits per arbre. Les barres d'error corresponen a l'error estàndard de les mitjanes. Lletres diferents indiquen valors d'incidència significativament diferents segons Tukey ($P=0,05$).

2. Descripció i seguiment dels símptomes

Per la descripció dels símptomes de la malaltia es va procedir a l'observació i diferenciació dels símptomes externs de les necrosi apicals de mostres d'aproximadament 20 fruits de cada varietat. Es van observar fruits entre l'estadi Gf fins a Gf+60 o més. Els fruits que mostraven símptomes externs de BAN (necrosi localitzada a la zona apical, de color bru i no negre) es van seccionar longitudinalment per observar el progrés de la necrosi als teixits interns del fruit, la seva consistència i coloració.

A la taula 4 s'exposa un resum de la simptomatologia externa i interna observada en fruits afectats per la BAN al llarg de tot el període de desenvolupament. A les figures 4, 5 i 6 es mostren els símptomes de BAN en alguns dels fruits analitzats. Exteriorment es van observar necrosi circulars i seques a la zona apical dels fruits. Es tractava de lesions de diàmetre variable, des de mil·límetres fins a 1- 2 cm. Als estadis inicials es van observar necrosi de color bru amb un to vermell evolucionant cap a tons més foscos en infeccions esteses i cap a la meitat del desenvolupament. En algun cas es va aparèixer un halos necròtic envoltant la lesió. Al final del període es van observar necrosi brunes. Interiorment la necrosi evolucionava de la mateixa manera que a l'exterior d'un color bru a l'inici fins a un marró fosc quasi negre en infeccions molt

estes cap a la meitat del període de desenvolupament del fruit. En infeccions inicials a la llavor presentava un puntejat necròtic. En quant a la consistència, els teixits necrosats presentaven en general aparença humida però conservant la fermesa. En estadis avançats de la malaltia es va observar el teixit desfet.

A partir de les dades de teixits necrosats per cada data i varietat es van calcular les freqüències de teixits afectats. Es van fer grups aleatoris de 3-5 fruits considerats com a repeticions per cada data i varietat. Amb aquests valors es va realitzar l'anàlisi de la variança per analitzar les diferències en funció de la varietat i el teixit. Aquest va indicar un efecte molt significatiu del tipus de teixit ((P>F)=0,0003, $R^2=0,6$) i de la interacció data-teixit ((P>F)=0,0173) en el percentatge de fruits necrosats, però no va indicar un efecte significatiu de la data ((P>F)=0,0958), ni de la varietat ((P>F)=0,5715), ni de la resta d'interaccions ((P>F)>0,1). Al no observar diferències entre varietats es van analitzar els resultats globals dels fruits de les tres varietats en cada data.

A la Figura 7 es mostra la freqüència de la necrosi als diferents teixits dels fruits al llarg del seu període de desenvolupament. Es pot observar l'evolució i progrés de la necrosi des dels teixits exteriors a l'inici del desenvolupament del fruit, moment en que el 100 % dels fruits van presentar necrosi a l'epicarp i al mesocarp i el 60 % dels fruits a l'endocarp mentre que cap patia necrosi a la llavor. En avançar el desenvolupament del fruit es va observar un increment en la freqüència de les necrosis als teixits interiors. Entre els estadis de GF+17 i Gf+40 tots els teixits dels fruits patien necrosi amb una freqüència entre el 60 al 100%. A partir de l'estadi Gf-45 i coincidint amb la lignificació de l'endocarp es va observar un descens brusc en la freqüència de les necrosis a l'endocarp i a la llavor, mantenint-se els símptomes a l'epi i mesocarp.

Taula 4. Descripció dels símptomes observats en fruits afectats per BAN al llarg del desenvolupament en tres varietats de noguera.

Data	Estadi ^a	Símptomatologia ^b				Altres observacions
		Color		Consistència		
		Exterior	Interior	Exterior	Interior	
22/5	Gf	Bru vermell	Bru	Molt sec	Humit, molt ferm	Enfonsament del teixit. En cas de fruits molt petits la infecció assoleix la llavor
10/6	Gf+18	Bru vermell	Bru	Molt Sec	Humit, ferm	Lesions més profundes (endocarp i llavor), amb trencament del teixit al voltant de la lesió
17/6	Gf+25	Bru vermell	Bru puntejat	Sec	Humit, ferm	Lesions marcades i profundes (afectant a la llavor) amb el perímetre trencat. Halos envoltant les lesions. Infecció avançant per l'estigma. Nous sense lesió externa
24/6	Gf+32 (Gf+4)	Bru Bru fosc	Bru puntejat	Sec	Humit- ferm	Lesions més irregulars. Teixit enfonsat
3/7	Gf+41 (Gf+13)	Bru Bru fosc	Bru fosc puntejat	Sec	Humit desfet	Lesions irregulars enfonsades, amb el perímetre trencat i profundes. Infecció avançant per l'estigma amb expansió cap al lateral. Llavor amb puntejat
19/7	Gf+57 (Gf+29)	Bru	Bru vermell	Sec	Humit ferm	Lesions molt localitzades poc profundes (mesocarp i endocarp)
30-jul	Gf+68 (Gf+40)	Bru	Bru clar vermell	Sec	Humit ferm	Lesions poc profundes,
15-ago	Gf+83 (Gf+55)	Bru	Bru clar vermell	Sec	Humit ferm	Lesions superficials(mesocarp), no afecten la llavor

^aEstadi de desenvolupament del fruit en cada data per les varietats Chandler, Hartley i entre parèntesis Franquette

^bProgrés de la infecció en els teixits del fruit, color i consistència de les necrosis. Observacions realitzades en 10-15 fruits de cada una de les varietats de noguera estudiades (Chandler, Hartley i Franquette) en cada data.



Figura 4. Síntomes de BAN en fruits de noguera en els estadis inicials del desenvolupament



Figura 5. Síntomes de BAN en fruits de noguera cap a la meitat del seu desenvolupament



Figura 6. Síntomes de BAN en fruits de noguera abans i després d'iniciar-se l'enduriment de l'endocarp.

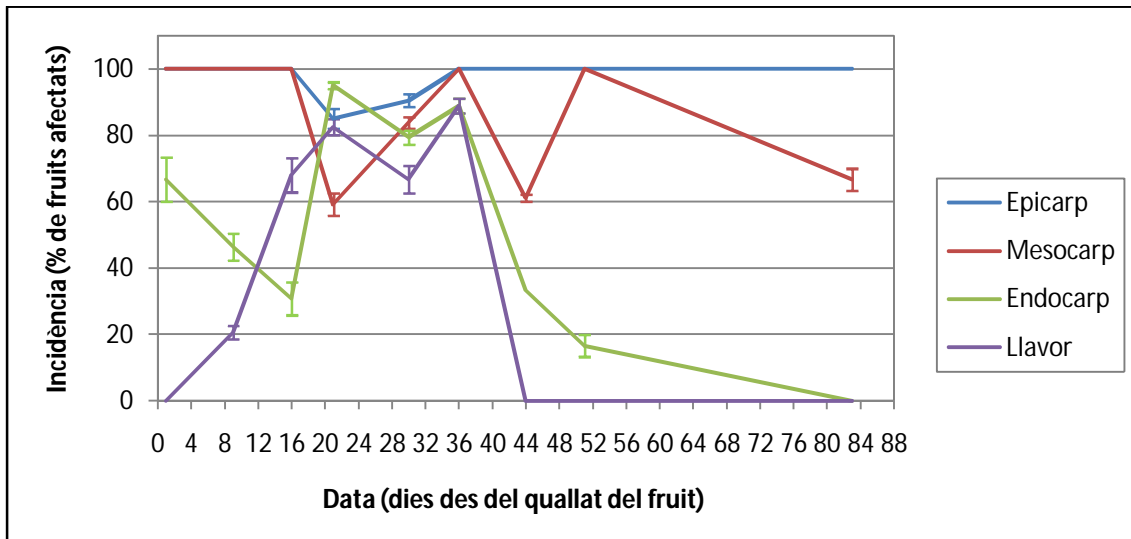


Figura 7. Evolució dels teixits afectats per BAN al llarg del temps. Els valors corresponen a la mitjana de les 3 varietats amb 3 repeticions de 3-5 fruits per repetició. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana.

3. Aïllament i identificació dels microorganismes associats a la BAN

Es van escollir fruits de les tres varietats amb clars símptomes de necrosi apical bruna per procedir a l'aïllament dels microorganismes presents a les lesions. Es van realitzar extraccions de cada teixit (mesocarp, endocarp i llavor).

Els microorganismes aïllats van correspondre al bacteri *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* i als fongs *Fusarium* sp. i *Alternaria* sp.

La identificació dels bacteris aïllats com a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* es va fer en base a la coloració taronjada i consistència mucosa de les colònies crescudes en agar YDC i a la coloració taronjada i la formació d'halos en medi TMM, semi selectiu per *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (figura 8). Aïllats representatius de les diferents soques aïllades es van seleccionar per a una identificació més acurada mitjançant tècniques moleculars que van confirmar la seva identitat. Aquesta identificació es va realitzar al laboratori de Pathologie Végétale del centre INRA d'Angers (França)

Cultius purs dels fongs aïllats a les mostres es van identificar en base a la seva morfologia a nivell de gènere. Els fongs aïllats van correspondre als gèneres *Alternaria* sp. i *Fusarium* sp. En el cas dels aïllats d'*Alternaria* (figura 9), degut a la gran diversitat

i complexitat morfològica del gènere no es va realitzar la determinació de l'espècie. En canvi, sí es va realitzar la identificació de 21 dels 31 aïllats de *Fusarium* spp. Es va observar que aquests pertanyien a 6 espècies diferents llistades a la taula 5. L'espècie aïllada amb major freqüència va ser *F. chlamidosporum* (25,8%) seguida de *F. lateritium* (16%), *F. solani* i *F. semitectum* (12,9%). Per últim *F. poae* i *F. reticulatum* es van aïllar ocasionalment (3,2%), (figura 10, taula 5)

Es va calcular el percentatge de microorganismes diferents aïllats en cada teixit. Considerant tres grups de 3-5 per varietat i data es van calcular les mitjanes i es va realitzar l'anàlisi estadística.

Com s'observa a la Figura 11, el bacteri *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* va ser el microorganisme aïllat amb major freqüència, en el 85-100 % dels fruits de les tres varietats. El bacteri es va aïllar de forma constant en els diferents teixits afectats al llarg de tot el cicle de desenvolupament. Respecte als fongs del gènere *Fusarium* i *Alternaria* aquests es van aïllar en menor freqüència i de forma variable al llarg del període d'estudi. En les tres varietats el gènere *Alternaria* es va aïllar en major freqüència a l'inici i el final del període de desenvolupament, mentre el gènere *Fusarium* es va aïllar més freqüentment cap al final del mateix període (a partir de Gf+30) en el cas de les varietats Hartley i Franquette.

Pel que fa a la presència de microorganismes en els diferents teixits dels fruits, a la Figura 12 s'observa que el bacteri *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* es va aïllar consistentment, en freqüències elevades en tots els teixits interns que presentaven necrosis, entre un 70 i un 90 % dels casos. Els fongs es van aïllar amb menor freqüència, un 10-30 % dels teixits necrosats presentaven fongs del gènere *Fusarium* i entre un 5-40 % d' *Alternaria*. Aquests es van aïllar de forma variable en els diferents teixits, *Fusarium* es va aïllar amb baixa freqüència en tots els teixits mentre *Alternaria* només es va aïllar en el mesocarpi i l'endocarp.

Analitzant la presència de microorganismes en els diferents teixits de cadascuna de les tres varietats, a la figura 13 es posa de manifest un comportament similar pel que fa a les infeccions pel bacteri *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* mentre que els fongs es van aïllar de diferents teixits i amb diferent freqüència segons la varietat. Així en fruits de la varietat Franquette només es van aïllar fongs en el mesocarpi i amb baixa freqüència (20-35%), en la varietat Chandler *Alternaria* sp. es va aïllar només del

mesocarpi en un 70% dels casos i *Fusarium* sp. en tots els teixits amb baixa freqüència, 25-30% dels casos al mesocarpi i endocarp i només en un 5% a la llavor. En quant a la varietat Hartley, *Alternaria* sp. es va aïllar del mesocarpi en major freqüència (75%) i de l'endocarp (20%), *Fusarium* es va aïllar dels tres teixits amb una freqüència baixa i constant (20%).

Es va realitzar l'anàlisi de la variança per observar l'efecte del teixit i la varietat en cada un dels microorganismes aïllats. No es va trobar un efecte significatiu de la varietat ni del teixit en el cas de *Fusarium* ($(P>F)>0,4$) així com tampoc en el cas de *Xanthomona arboricola* pv. *juglandis* ($((P>F)>0,5)$). En el cas d'*Alternaria* es va trobar un efecte significatiu del teixit d'origen ($(P>F)=0,0001$) però no de la varietat ni de la seva interacció.

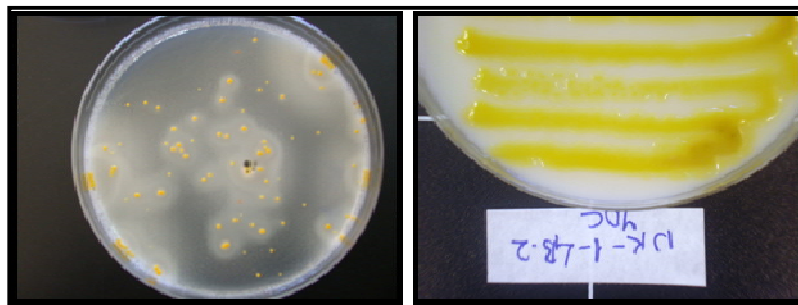


Figura 8. Aspecte dels cultius de *X. a* pv. *juglandis* en medi TMM (esquerra) i YDC (dreta)

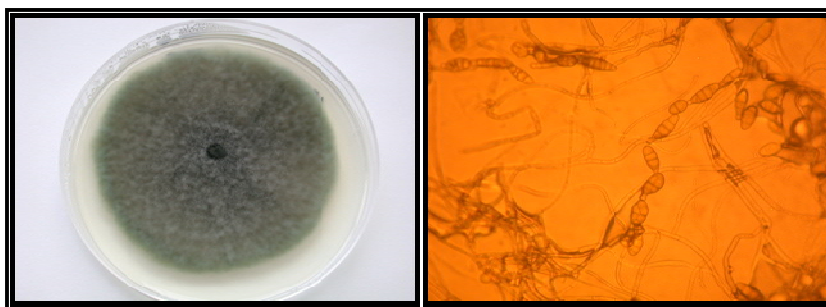


Figura 9. *Alternaria* sp. en cultiu sobre medi de PDA (esquerra) i vista dels conidis al microscopi òptic (dreta)

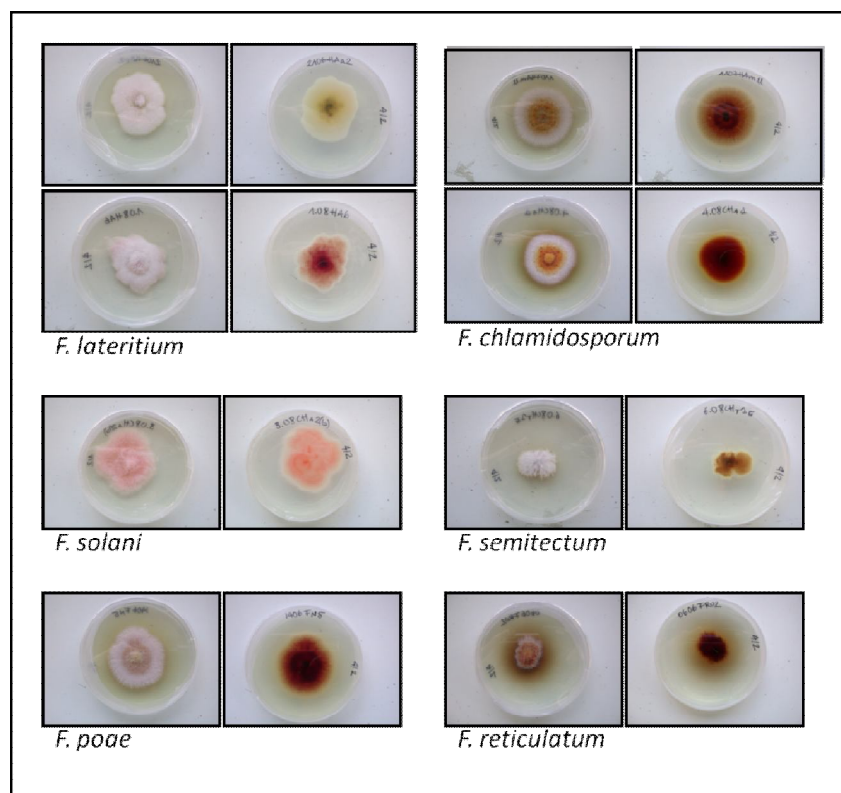


Figura 10. Espècies de *Fusarium* aïllades a partir de fruits afectats per BAN provinents de Cornudella de Montsant, Tarragona

Taula 5. Espècies de *Fusarium* aïllades en els fruits afectats per BAN

Espècie	Nombre d'aïllats	Freqüència
<i>F. chlamidosporum</i>	8	25.8%
<i>F. reticulatum</i>	1	3.2%
<i>F. poae</i>	1	3.2%
<i>F. lateritium</i>	5	16%
<i>F. solani</i>	4	12.9%
<i>F. semitectum</i>	4	12.9%
No identificada	8	25.8%

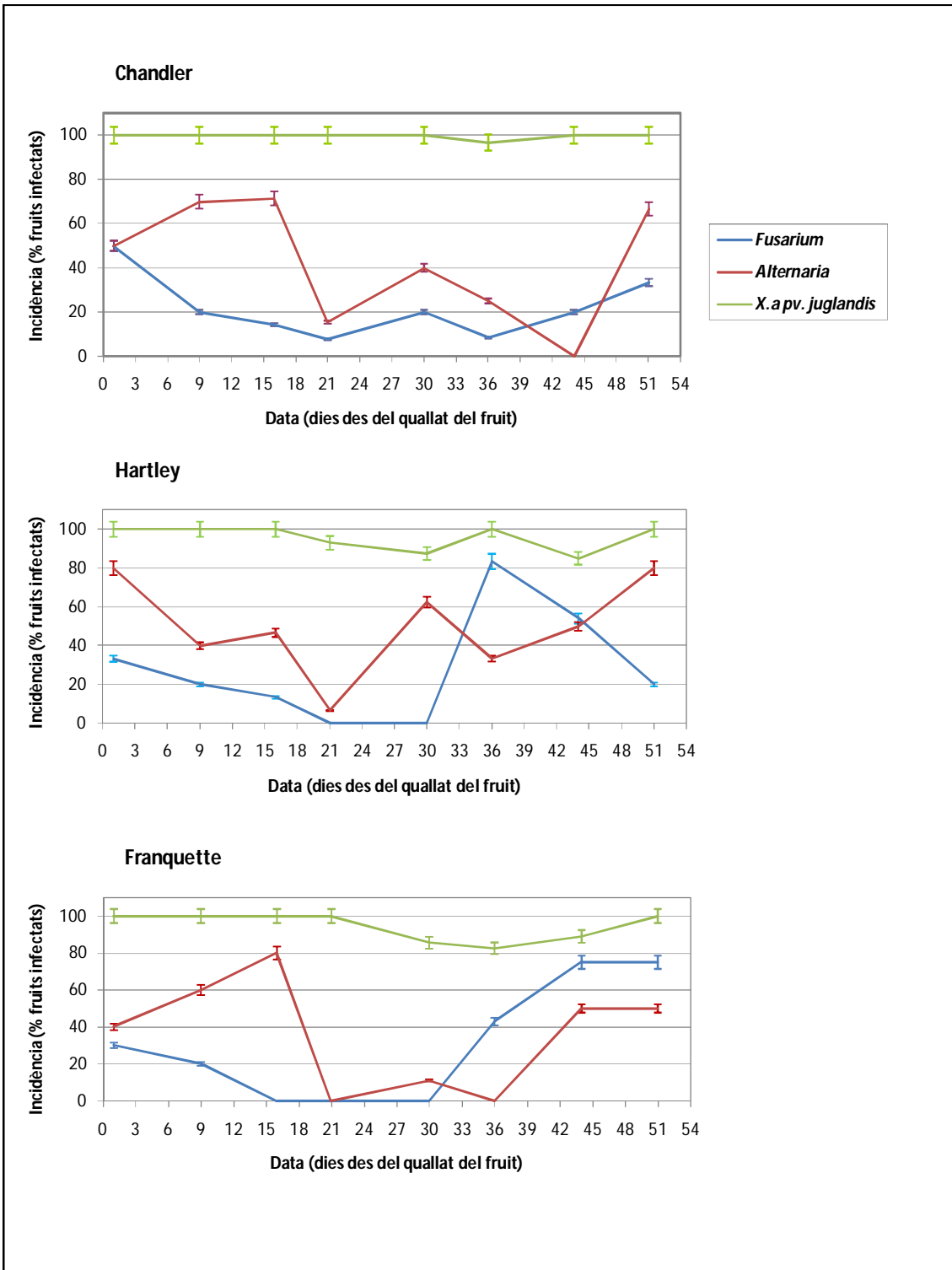


Figura 11. Evolució dels microorganismes aïllats de fruits de les varietats Chandler, Hartley i Franquette al llarg del període de desenvolupament del fruit. Els valors corresponen a la mitjana de tres repeticions amb 3-5 fruits per repetició. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana.

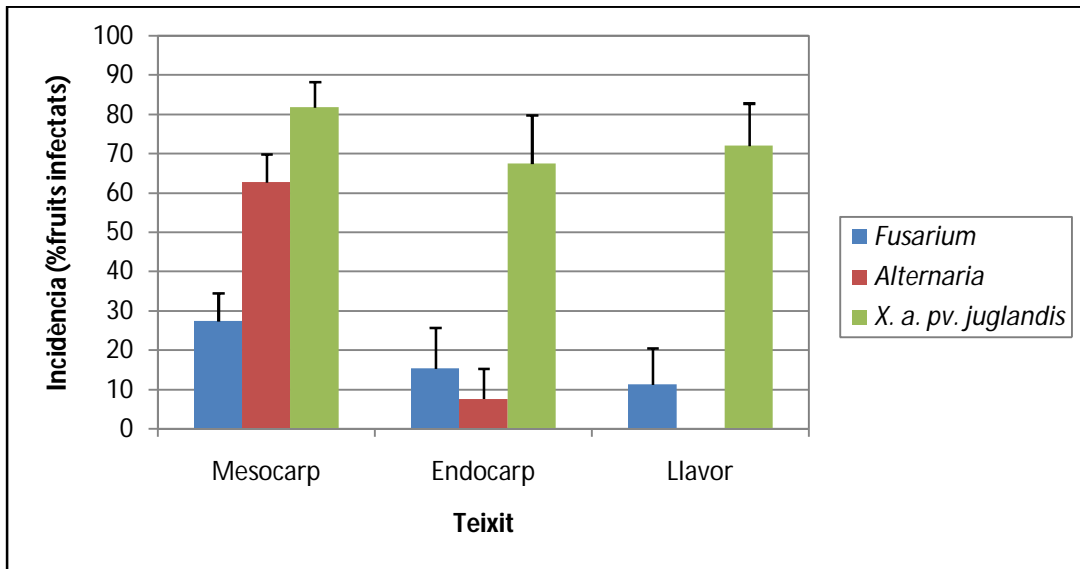


Figura 12. Microorganismes aïllats en cada un dels teixits de fruit de noguera de les varietats Chandler, Hartley i Franquette afectats per BAN. Els valors corresponen a la mitjana de les tres varietats durant tot el període de desenvolupament. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana.

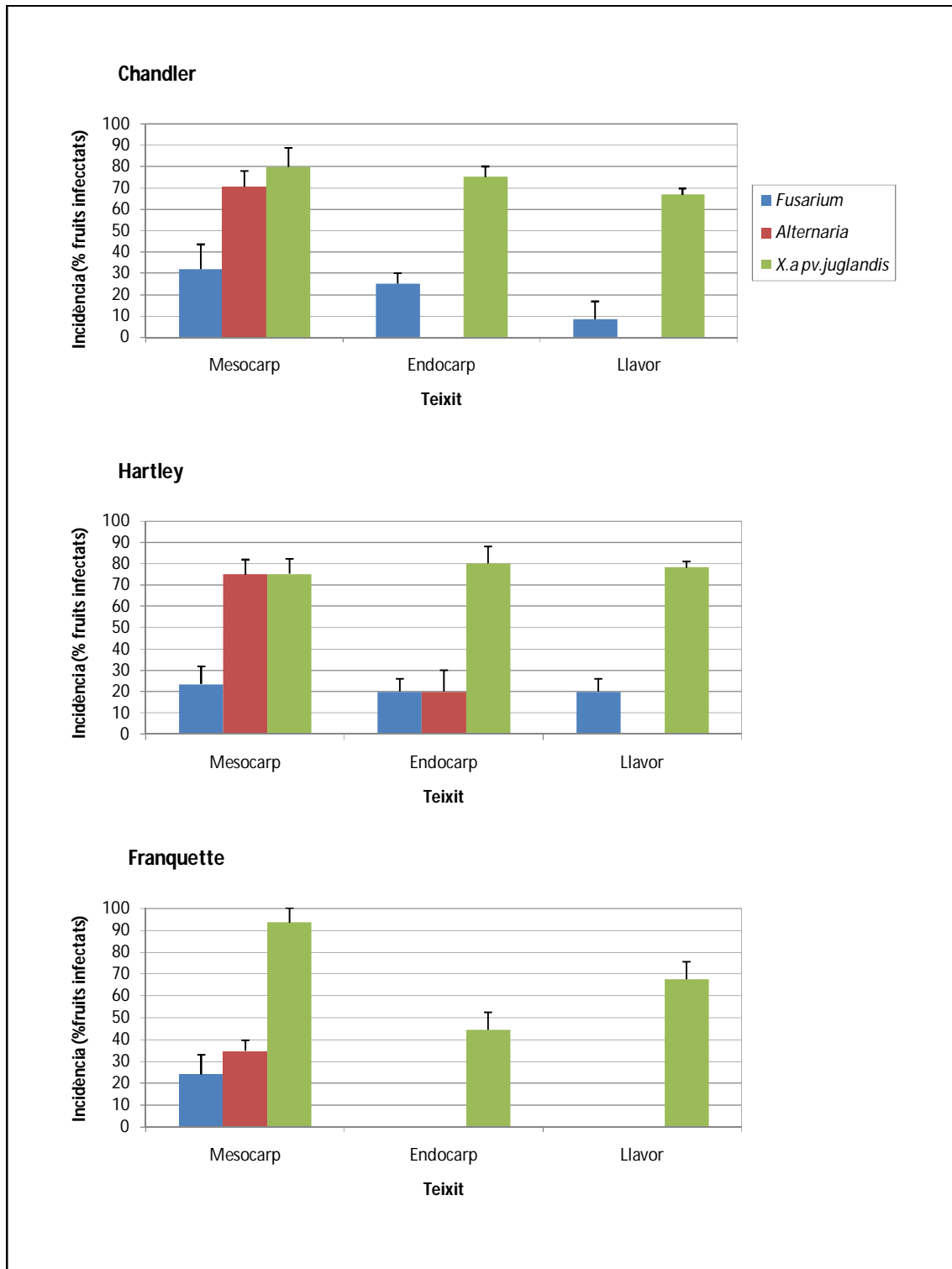


Figura 13. Microorganismes aïllats en cada un dels teixits de fruits de noguera de les varietats Chandler, Hartley i Franquette al llarg de tot el període d'estudi. Els valors corresponen a la mitjana de totes les dates. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana.

4. Patogenicitat dels microorganismes aïllats

Es van escollir 6 aïllats de *Fusarium*, 7 soques d'*Alternaria* i 7 de *X. arboricola* pv. *juglandis* i es van inocular en fruits immadurs de noguera.

A la taula 6 s'exposen els resultats de l'assaig de patogenicitat. Es van anotar els símptomes externs i interns que presentaven els fruits inoculats, coloració de les necrosis, consistència i abast de la infecció. Les figures 14 i 15 mostren les infeccions produïdes pels inòculs d'*Alternaria* sp., *Fusarium* spp. i *X.a* pv. *juglandis*. En seccionar els fruits per l'avaluació dels símptomes interns es va observar l'endocarp en procés d'enduriment.

Es va observar que en el cas dels fruits inoculats amb fongs les necrosis provocades eren en general superficials amb evolució cap al lateral, l'inòcul de la zona apical va evolucionar amb més freqüència que els laterals cap als teixits interiors a través de l'estigma. Les espècies de *Fusarium* van provocar amb freqüència necrosis brunes esteses mentre que *Alternaria* va provocar necrosis més fosques, menys profundes i en un nombre menor dels casos.

En el cas dels fruits inoculats amb *X. arboricola* pv. *juglandis*, les necrosis van evolucionar amb més freqüència cap als teixits interiors assolint l'endocarp i en ocasions la llavor. Tant exterior com interiorment les lesions provocades per l'inòcul bacterià van prendre una coloració bruna.

A partir d'alguns fruits escollits es va reaïllar amb èxit el microorganisme inoculat.

En base a aquests resultats es va considerar patogènic el microorganisme que provoqués necrosis progressives des de la zona apical cap als teixits interiors del fruit podent assolir la llavor. Dins els patogènics es van establir els nivells de virulència en funció de la intensitat de la infecció interna, essent poc virulents (1) els aïllats que no van arribar a produir infecció a l'endocarp (cas dels aïllats d'*Alternaria*) i molt virulents (2) els que van produir necrosis a l'endocarp i en algun cas a la llavor (cas de *Fusarium* i de *X. a* pv. *juglandis*).

Taula 6. Descripció dels símptomes observats en fruits de noguera de la varietat Chandler(Gf+30) inoculats amb soques dels microorganismes aïllats de fruits amb símptomes de BAN.

Microorganisme Soca	Origen ^a	Símptomes ^b			Consistència	Progrés	Patogenicitat en fruits de noguera ^c
		Color		Interior			
		Exterior	interior				
<i>Alternaria</i> spp.							
1	M	Halos necròtic bru	-	-	Apical Lleuger	-	
2	M	-	-	-	Sense evolució	-	
3	M	Halos necròtic bru fosc	Quasi negre	Humit desfet	Mesocarp, evolució lateral	+ (1)	
4	M	Bru fosc quasi negre	Quasi negre	Humit desfet	Mesocarp lleuger	+ (1)	
5	E	Bru fosc	Marró fosc	Humit desfet	Mesocarp	-	
6	E	Bru fosc	Marró fosc	Humit desfet	Mesocarp	+ (1)	
7	M	Bru fosc	Marró fosc	Humit desfet	Mesocarp	+ (1)	
<i>Fusarium</i> sp.							
1	M	Halos necrotic apical.	-	No evolució. Sec.	Mesocarp superficial	-	
2 <i>chlamidosporum</i>	L	Bru	Marró fosc	Humida	Endocarp, inicial llavor	+ (2)	
3 <i>semitectum</i>	M	Negre..	Quasi negre	Humida	Mesocarp	+ (1)	
4 <i>Lateritium</i>	M	Bru fosc	Marró fosc	Humit	Lleuger a l'endocarp	+ (1)	
5 <i>Solani</i>	M	Bru vermell	Marró fosc	Exterior sec interior humit	Mesocarp i endocarp	+ (2)	
6 <i>Chlamidosporum</i>	M	Bru	-	Sec	Endocarp i llavor	+ (2)	
<i>Xanthomona arboricola</i> pv. <i>Juglandis</i>							
1	M	Halos	Bru	Sec	Mesocarp i endocarp	+ (2)	
2	M	Halos	-	-	Punxades seques	-	
3	L	Bru	Marró fosc	Humida	Mesocarp i endocarp	+ (2)	
4	L	Bru	Marró fosc	Humida	Mesocarp i endocarp	+ (2)	
5	L	Bru	Negre	Lleugerament humida	Mesocarp	+ (1)	
6	M	-	-	-	Punxades seques	-	
7	M	Bru	Marró fosc	Exterior seca, interior lleugerament humida	Mesocarp i endocarp	+ (2)	

^aTeixit símptomàtic a partir del què es vaïllar el microorganisme. Mesocarp (M), endocarp (E) o llavor (L)

^bCaracterístiques de les necrosis observades el els fruits inoculats

^cPatogenicitat. + patogènic, - no patogènic i virulència en els patogènics 1:poc virulent, 2: molt virulent.



Figura 14. Aspecte dels fruits inoculats de la varietat Chandler amb soques de *Fusarium* sp. (esquerra) i *Alternaria* sp. (dreta) aïllades de fruits afectats per BAN



Figura 15. Aspecte dels fruits de la varietat Chandler inoculats amb soques de *X. a* pv. *juglandis* aïllades de fruits afectats per BAN

DISCUSSIÓ

En l'estudi de l'evolució de la malaltia al llarg del temps, la incidència augmenta ràpidament en els estadis inicials de desenvolupament del fruit, moment en que els fruits són més sensibles a la infecció. El final d'aquest període coincideix amb el moment en que s'observa una caiguda important dels fruits afectats en les plantacions de noguera. De forma similar, en el cas de la bacteriosi de la noguera són les infeccions en estadis precoços les que provoquen una major caiguda de fruits (Charlot i Germain, 1988)

Tot i presentar una tendència semblant en el progrés de la malaltia, la varietat Chandler es va mostrar més sensible a la BAN que la varietat Hartley, amb valors de incidència significativament superiors. En el cas de la varietat Franquette, més tardana, aquesta es va mostrar menys sensible a la BAN que les varietats Hartley i Chandler. Podem dir per tant que existeix diferent sensibilitat varietal a la BAN i que les varietats més tardanes com Franquette, que entren en estadi Gf més tard, són menys sensibles. Aquesta diferència s'observa també en la sensibilitat a la bacteriosi provocada per *X.a pv. juglandis*. Les varietats Chandler i Franquette presenten una sensibilitat a la bacteriosi baixa i molt baixa respectivament, fenomen lligat també a l'època de quallat i desenvolupament del fruit (Aletà i col., 2001).

D'altra banda, estudis sobre necrosis apicals en noguera han posat de manifest que la sensibilitat dels fruits de noguera a les necrosis apicals en general, es veu afectada per l'estat nutricional dels arbres; la carència de calci, sigui deguda a la pobresa del sòl en aquest element o a la baixa disponibilitat causada per problemes de ph o de textura redueix la resistència de les cèl·lules a la infecció (Garcin i Duchesne, 2001). Per tant desordres d'aquest tipus poden també afectar la sensibilitat dels fruits a la BAN provocant diferències entre varietats, zones geogràfiques i finques.

En aquest treball s'ha posat de manifest que els símptomes de la BAN es diferencien dels provocats per *X. a pv. juglandis* en el color i consistència de les lesions. Els símptomes de BAN es corresponen a lesions necròtiques a la zona apical, de geometria circular, color bru- vermellós i aparença exterior seca, mentre la bacteriosi, sigui apical o lateral, cursa amb necrosis de geometria irregular, negres i de consistència humida sobre tota la superfície del fruit. Interiorment, en infeccions poc evolucionades, els

teixits afectats per BAN presenten una coloració vermellova i consistència més ferma que els casos de lesions de bacteriosi, color negre i consistència humida amb teixit desfet, en estadis avançats de la malaltia les lesions evolucionen cap a un color bru fosc fins a negre amb consistència desfeta. Aquestes observacions coincideixen amb les realitzades a França i Italia. A les finques estudiades en aquests països es van observar que els fruits afectats per BAN presentaven taques brunes a la zona pistil·lar estenent-se cap a la base fins agafar una consistència aquosa i color negre (Belisario i col., 2001).

L'evolució i progrés de la necrosi va des dels teixits exteriors a l'inici del desenvolupament del fruit, fins als teixits interiors en avançar el desenvolupament i coincidint amb el període en què la incidència augmenta ràpidament a camp. Entre els estadis de GF+17- Gf+40 els teixits interiors dels fruits afectats pateixen necrosi amb una freqüència entre el 60 al 100% coincidint amb el període de màxima sensibilitat a la malaltia observada a camp. Les observacions de l'evolució interna fan pensar que el patogen aprofita el canal de l'estigma per avançar cap als teixits interiors. Es descarta la possibilitat d'inici d'infeccions per part de poblacions endòfitas presents en les flors femenines abans del quallat o en l'ovari en el moment de la fecundació. A partir de l'estadi Gf-45 i coincidint amb la lignificació de l'endocarp es produeix un descens bruscat en la freqüència de les necrosi a l'endocarp i a la llavor, mantenint-se els símptomes a l'epi i mesocarp. Això indica que els teixits joves són més sensibles a les infeccions, des del moment de quallat del fruit fins a l'estadi Gf+30-45 es produeixen les infeccions que provoquen la caiguda més important de fruits. Les infeccions més tardanes són menys freqüents i menys severes, sense arribar a necrosar la llavor. Infeccions superficials a l'endocarp poden provocar taques permanents a la closca endurida disminuint el valor de la collita.(Miller i Bollen, 1946) Podem afirmar, per tant, que la BAN afecta sobretot fruits en desenvolupament des de quallat fins a Gf+30-45 i que durant aquest període es donen les condicions favorables per a que els microorganismes implicats produeixin les infeccions. La major sensibilitat dels fruits joves també s'ha observat en les infeccions de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, causant de la bacteriosi de la noguera (Miller i Bollen, 1946). De fet en el cas de la bacteriosi de la noguera s'ha observat que en estadis inicials del desenvolupament del fruit, les zones més sensibles a la infecció són les localitzades a la zona apical. Són aquestes infeccions primerenques les que arriben a assolir els teixits interiors, provocant en la majoria dels casos la caiguda dels fruits. Infeccions originades quan el fruit ha

assolit tres quartes parts del seu desenvolupament queden confinades als teixits exteriors i en algun cas a la superfície de l'endocarp (Miller et Bollen, 1946).

En quant als microorganismes relacionats amb la malaltia no s'han trobat diferències entre varietats. Es pot afirmar que *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* està relacionat amb l'aparició d'aquesta al ser l'únic microorganisme aïllat consistentment en tots els fruits i teixits afectats. Els fongs han aparegut de forma intermitent. *Alternaria* sp. només s'ha aïllat dels teixits més exteriors, sense trobar-se en cap cas en necrosis de la llavor. *Fusarium* sp. s'ha aïllat en tots els teixits amb freqüències baixes i insuficients per afirmar que sigui el principal causant de la malaltia. Es tracta de colonitzadors oportunistes que aprofiten el debilitament del fruit afectat per l'infecció de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* i és possible que afavoreixin o intensifiquin el desenvolupament dels símptomes característics de la BAN.

Aquests resultats difereixen dels obtinguts per Belisario i col. (2002), en que *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* només es va aïllar ocasionalment en fruits afectats per BAN i en canvi el microorganisme més aïllat va correspondre al gènere *Fusarium* sp. (*F. semitectum* i *F. equiseti*), seguit d' *Alternaria* sp. En el cas del nostre estudi les espècies de *Fusarium* més freqüents van ser *F. chlamidosporum* i *F. lateritium* seguides de *F. solani* i *F. semitectum*. D'acord amb els resultats de Belisario i col. la BAN es considera una malaltia complexa amb diferents espècies de *Fusarium* implicades. D'altra banda, estudis realitzats per altres autors sobre els microorganismes presents en lesions de fruits de noguera, tant laterals com apicals, indiquen que el bacteri *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* es de forma consistent el microorganisme més abundant i aïllat en major freqüència, i que diferents espècies de *Fusarium* i *Alternaria* hi son presents de forma ocasional (Arquero et al., 2005).

Pel que fa a la patogenicitat dels microorganismes aïllats, en el cas de l'inoculació de soques de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, aquestes són les que més s'han apropiat a la reproducció dels símptomes de BAN exteriorment, provocant necrosis amb una certa coloració bruna- vermellosa. Interiorment han provocat necrosis en els teixits més profunds. En el cas de l'inoculació amb fongs, les infeccions han estat limitades als teixits més exteriors expandint-se en general la necrosis cap al lateral dels teixits i sense evolució cap a l'interior. *Fusarium* ha mostrat una capacitat patogènica i de reproducció dels símptomes de la BAN major que *Alternaria*.

Aquests resultats confirmen el bacteri *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* com a agent causant de la malaltia. Tot i tractar-se del mateix bacteri que provoca la bacteriosi de la noguera, els símptomes a la zona apical del fruit poden diferir en alguns casos dels típics de la bacteriosi. Les causes d'aquesta diferència semblen estar relacionades amb la fisiologia del fruit i/o amb la presència d'altres microorganismes com *Fusarium* sp. que poden contribuir a la intensificació dels símptomes.

Caldrien estudis complementaris per conèixer millor el paper que juguen en el desenvolupament de la malaltia i els símptomes que provoquen o afavoreixen les espècies de *Fusarium* que s'han mostrat patogèniques en fruits de noguera.

CONCLUSIONS

1. Els símptomes de la Necrosi bruna apical de la noguera son característics i diferenciats dels provocats per altres malalties bacterianes què afecten els fruits de noguera. Apareixen lesions apicals de geometria circular color bru i aspecte sec, interiorment les necrosis són brunes humides i fermes, evolucionant cap a una coloració més fosca amb el temps.
2. Existeix diferent sensibilitat varietal, sent les varietats més tardanes com Franquette les menys sensibles a la malaltia.
3. Els fruits joves (des de el quallat fins a Gf+30) son més sensibles a la malaltia, en condicions naturals. Es al final d'aquest període quan s'observa la màxima incidència de la malaltia i la màxima severitat, provocant una major caiguda de fruits amb tots els teixits afectats.
4. Les infeccions evolucionen des dels teixits exteriors cap als interiors, descartant que siguin provocades per poblacions endòfites.
5. El principal agent causal de la malaltia és *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, aïllat en tots els teixits, varietats i moments de forma consistent. Aquest s'ha demostrat patogènic en fruits de noguera i capaç de reproduir els símptomes de BAN.
6. *Fusarium* sp. i en menor mesura *Alternaria* sp. poden contribuir a intensificar els símptomes de la malaltia. Representants dels dos gèneres s'han demostrat patogènics en fruits de noguera sent *Fusarium* sp. el que més s'ha aprofitat a reproduir els símptomes característics de la BAN

BIBLIOGRAFIA

Adaskaveg, J. E., Holtz B. A., T. J. Michailides, and W. D. Gubler. 2008. Efficacy and Timing of Fungicides, Bactericides, and Biologicals for Deciduous Tree Fruit, Nut, Strawberry, and Vine Crops. University of California, Cooperative extension, volum 33, capítol 3.

Adaskaveg J.E., Buchner R. P., Browne G. T., Gubler W. D. 2007. Management Guidelines for walnut blight. University of California, Riverside, Agriculture and Natural Resources nº 3471.

Aletà, N., Ninot, A., Moragrega, C., Llorente, I. i Montesinos, E. 2001. Blight sensitivity of spanish selections of *j. regia* . Acta Hort. (ISHS) 544:353-362

Atlas R. M., Parks L.C. 1996. Handbook of Microbiological Media. CRC Press, Florida, USA, segona edició.

Belisario, A., Forti, E., Santori, A., Corazza, L., Balmas, V. and Valier, A. 2001. Fusarium necrosis on persian (English) walnut fruit. Acta Horticulturae. 544:389-393

Belisario, A., Maccaroni, M., Corazza, L., Balmas, V., and Valier, A. 2002. Occurrence and etiology of brown apical necrosis on Persian (English) walnut fruit. Plant Disease. 86:599-602.

Berry, F. H. 1977. Control of walnut anthracnose with fungicides in a black walnut plantation. Plant Disease Reporter 61:378-379.

Burjachs i Casas F. 2006. Palinología y restitución paleoecológica. Revista Ecosistemas 15 (1): 7-16

Charlot G., Germain E. 1988. Le noyer. Nouvelles techniques. CTIFL (Centre Technique Interprofessionnel des fruits et légumes), Paris, France.

COST 873. 2008. Meeting Report. COST Action 873 – Bacterial Diseases of Stone Fruits and Nuts STF2.2 Meeting Field diagnosis and disease description of BAN on walnut Mudanya-Bursa, Turkey 02-03 July 2008. Consultat el maig del 2009. Accessible a http://www.cost873.ch/_uploads/_files/m_Marmora_MeetingReport.pdf

Garcin, A. i Duchesne, D. 2001. Walnut blight and apical necrosis. *Acta Horticulturae* 544:379-387

Gironde S., Guillaumes J., Manceau C. 2009. Specific detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* pathogen on walnut. En premsa

Infoagro. 2009. El cultivo de la nuez. Consultat el març 2009. Accessible a http://www.infoagro.com/frutas/frutos_secos/nogal.htm

MARM (Ministerio medio ambiente rural y marino). 2008. Anuario de estadística agroalimentaria, capitulo 20.10, frutales de fruto seco. Consultat l'abril del 2009. Accessible a: <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2008/indice.asp?parte=3&capitulo=20&grupo=10>

Miller, P.W., Bollen, W. B. 1947. Walnut bacteriosis and its control. USA Department of Agriculture, USA

Nelson P. E., Toussoun T. A., Marasas F. O. 1983. *Fusarium species : an illustrated manual for identification*. The Pensilvania State University Press, USA

Smith I. M. *Manual de enfermedades de las plantas*. 1992, Mundi-Prensa, Madrid.

USDA. Foreign Agricultural Service. 2008. *Tree Nuts:World Markets & Trade*. Consultat el maig del 2009. Accessible a: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/TreeNuts.pdf>

Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Schaad, N. W., Jones, J. B. I Chun, W. 2001. *Plant pathogenic Bacteria*. APS press. Minnessota, USA, 3ª edició