


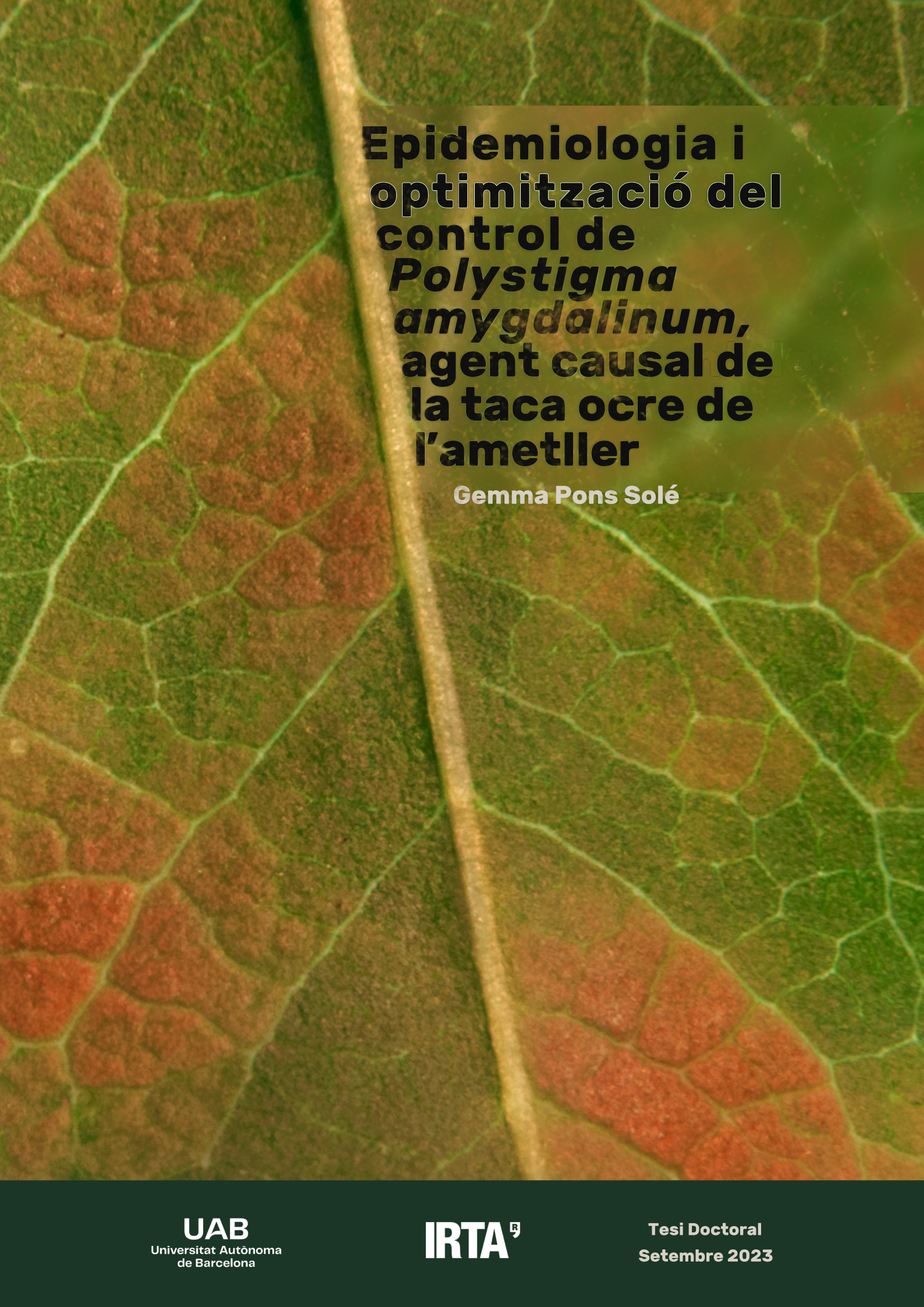


**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Epidemiologia i  
optimització del  
control de  
*Polystigma  
amygdalinum*,  
agent causal de  
la taca ocre de  
l'ametller**

**Gemma Pons Solé**







**Epidemiologia i optimització del control de  
*Polystigma amygdalinum*, agent causal  
de la taca ocre de l'ametller**

Epidemiology and control optimization of  
*Polystigma amygdalinum*, causal agent  
of almond red leaf blotch

**TESI DOCTORAL**

**Gemma Pons Solé**

Memòria presentada per optar al títol de Doctora  
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorat en Biologia i Biotecnologia Vegetal

**Directors:**

Dr. Jordi Luque Font

Dra. Soledad Martos Arias

Bellaterra, setembre de 2023



*A les meves àvies,  
als meus avis*





## Agraïments

Durant aquests quatre anys, són tantes les històries i sou tantes les persones implicades, que em sento molt afortunada i alhora es fa molt difícil escriure aquestes línies per intentar donar-vos les gràcies a totes les que d'una manera o altra m'heu acompanyat durant aquesta etapa. Una etapa que ara s'acaba i que no ha pogut passar més ràpid. Diuen que si el temps passa ràpid és que t'ho passes bé, i en aquest cas segur que ha estat així.

Per començar, aquesta tesi no seria possible sense la direcció del Jordi Luque i la Soledad Martos. Gràcies per donar-me la oportunitat de treballar i aprendre tant amb vosaltres, per la confiança des del primer dia i per l'enorme compromís i dedicació durant aquests anys. Em sento molt privilegiada d'haver compartit aquest temps amb vosaltres, gràcies!

Al Xavier Miarnau i la Laura Torguet de l'IRTA Fruitcentre, a Lleida, per ser el nostre contacte amb la realitat del sector agrícola i compartir amb nosaltres la vostra expertesa. Gràcies per estar sempre disposats a col·laborar i pel bon treball en equip. Gràcies també a tot el personal tècnic i de camp involucrat en els assajos de camp i l'obtenció de mostres per aquesta tesi (Lourdes, Guillem, Robert, Sergi, Neus), sense vosaltres aquest treball seria impossible.

Al Toni Vicent i la Elena Lázaro de l'IVIA, per la càlida acollida al vostre centre durant una setmana al poc de començar el doctorat, sent la meva primera presa de contacte amb el món dels models epidemiològics i l'R. Gràcies per les grans aportacions que heu fet a aquesta tesi, però també per estar sempre disposats a ajudar, per la positivitat i per ser tant didàctics, fent senzilles les coses difícils.

*I would also like to thank Professor Vittorio Rossi for supervising my stay in the Università Cattolica del Sacro Cuore (Piacenza, Italy). I feel so fortunate to have had the opportunity to work and learn from you and Dra. Irene Salotti. The epidemiological discussions and the time shared within your team has been so useful for me to clarify some epidemiological aspects of this thesis. Also, I would like to thank the colleagues in the Department for their kindness, and specially Valeria, Michele, and Miguel to make my free time in Piacenza funnier.*

A les companyes i companys de l'IRTA de Cabrils per crear un ambient de treball amable i acollidor, que fa anar a la feina amb un somriure. A l'Erick Zúñiga per passar-me el relleu de la taca ocre i ajudar-me sempre que ha fet falta. Al Jesús Ortíz per tants viatges a la Panadella, i a la Vicky Barnés per trobar sempre la manera d'ajudar al laboratori. A l'Eli, la Isa i la Núria pel bon treball en equip. A la Sofia per cuidar-nos. Gràcies a totes!

Als doctorands amb qui he compartit part de l'etapa, sigui a l'inici o en aquests últims mesos, gràcies pel suport incondicional i per demostrar que no tot és la feina! Una abraçada especialment forta a la Lídia, la Vasiliki, el Jonatan, la Mar, el Guillo i l'Aleix, per aquests anys d'amistat. Espero de tot cor continuar veient-nos. *Also, I want to thank Jeremy, Mitsos, and Antonis for the short but beautiful months you spent with us.*

Més enllà de la feina, anar a viure a Granollers durant aquesta etapa no va poder ser una millor decisió. Gràcies a tota la colla (Xexi, Sílvia, Arnau, Luna, Guille, Mar, Carles, Alberto, Laura, Mere, Clàudia, Albert, Enric, Sílvia) per tantes abraçades i per acollir-me des del primer dia al vostre grup, he tingut molta sort de poder conèixer-vos més. I sobretot gràcies Dani, per compartir tant i ser l'immillorable company de *pisito* durant tot aquest temps. Ha sigut i és molt divertit.

De la Canonja, gràcies infinites a les nenes: l'Ainoa, la Laia, la Marina A, el Dani, l'Alba, l'Arantxa, l'Arabia, la Marina C, la Danae i la Júlia; i al Comitè Lúdic: el Puni, l'Uri, la Gemma, la Laura, el Miquel, el Robert i el Joan. Gràcies a l'atzar per haver-nos fet coincidir des de petits al *cole* o al cau, i a totes vosaltres per cuidar el grup i fer-nos créixer. Malgrat el temps que pugui passar sense veure'ns, sempre feu que trobar-nos sigui l'essència de tornar a casa. Un agraïment extra al Joan Alberich per estar sempre a punt per tirar endavant tota classe de plans, i per la fotografia i el disseny de la portada de la tesi.

Finalment, m'agradaria donar les gràcies als meus germans Joan i David i sobretot als meus pares, per ensenyar-nos a estimar el que ens envolta, valorar les coses senzilles i relativitzar les nostres preocupacions. Ens heu ensenyat que mai és massa tard per aprendre res, animant-nos sempre a lluitar pel que ens motiva, encara que això pugui implicar que estiguem lluny i ens trobeu a faltar. Us estimo molt.

# Índex

<b>Resum</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Introducció general</b> .....	<b>9</b>
L'ametller .....	9
Taxonomia i aspectes generals .....	9
El cultiu de l'ametller en l'actualitat.....	10
<i>Origen i millora genètica</i> .....	10
<i>Producció</i> .....	11
<i>Reptes i perspectives de futur</i> .....	12
La taca ocre de l'ametller .....	13
<i>Polystigma amygdalinum</i> : taxonomia i aspectes generals.....	13
Distribució geogràfica .....	15
Cicle biològic i simptomatologia .....	15
Epidemiologia .....	17
Control.....	19
<i>Tractaments fungicides</i> .....	19
<i>Tolerància de les cultivars a la taca ocre</i> .....	21
<i>Tècniques de cultiu per a la reducció de l'inòcul</i> .....	21
Referències.....	22
<b>Objectius</b> .....	<b>31</b>
<b>Capítol 1: Evaluation of fungicides and application strategies for the management of the red leaf blotch disease of almond</b> .....	<b>35</b>
Introduction .....	35
Materials and Methods .....	36
Results .....	40
Discussion.....	44
References.....	46
<b>Capítol 2: Airborne inoculum dynamics of <i>Polystigma amygdalinum</i> and progression of almond red leaf blotch disease in Catalonia, NE Spain</b> .....	<b>51</b>
Introduction .....	51
Materials and Methods .....	52

Results .....	55
Discussion.....	57
References.....	59
Supporting information .....	61
<b>Capítol 3: Modeling the airborne inoculum of <i>Polystigma amygdalinum</i> to optimize fungicide programs against almond red leaf blotch .....</b>	<b>69</b>
Abstract.....	69
Introduction .....	70
Materials and methods .....	72
Results .....	78
Discussion.....	84
References.....	88
Supporting information .....	92
<b>Discussió general .....</b>	<b>97</b>
Referències.....	104
<b>Conclusions .....</b>	<b>111</b>
<b>Annex .....</b>	<b>117</b>
Articles científics .....	117
Articles tècnics i de divulgació.....	117
Contribucions a congressos i jornades .....	117
Disponibilitat de dades .....	118

## Resum

La taca ocre de l'ametller, causada pel fong ascomicet *Polystigma amygdalinum*, és actualment una de les malalties foliars més importants d'aquest cultiu en la conca mediterrània i particularment a Espanya. L'expansió del cultiu de l'ametller a nous emplaçaments, així com el repte d'intensificar el model de producció, es relaciona amb l'augment en la incidència que aquesta malaltia ha experimentat en les últimes dècades. Entre les possibles estratègies de control de la taca ocre, l'aplicació periòdica de fungicides és actualment la pràctica més emprada. No obstant, l'ús indiscriminat de fungicides té un impacte negatiu sobre el medi ambient, així com en la salut humana, motiu pel qual es recomana limitar la seva utilització als nivells estrictament necessaris.

La present tesi doctoral es planteja amb l'objectiu d'optimitzar el control de la taca ocre de l'ametller a partir de l'estudi de l'epidemiologia de *P. amygdalinum* i la seva modelització. En primer lloc, en el **Capítol 1** hem avaluat l'eficàcia d'una àmplia gamma de productes fungicides pel control de la malaltia, així com diverses estratègies d'aplicació. Els resultats mostren una major eficàcia dels productes sistèmics en comparació als productes de contacte. La incorporació d'un criteri meteorològic per programar les aplicacions fungicides resulta en una eficàcia en el control de la taca ocre similar a l'obtinguda amb l'estratègia tradicional d'aplicacions periòdiques, però alhora permet una reducció considerable en el nombre total de tractaments. Per contribuir a la millora en el coneixement de l'epidemiologia del patogen, en el **Capítol 2** hem monitorat l'inòcul aeri de *P. amygdalinum* durant tres temporades de cultiu, mitjançant tècniques moleculars de PCR quantitativa. Els resultats mostren que, en les condicions de cultiu de l'ametller a la zona de Lleida, la presència d'ascòspores aerovagants es correlaciona positivament amb les temperatures mitjanes suaus, d'entre 10 i 20 °C, i amb variables relacionades amb la humitat i la precipitació. Així mateix, s'ha observat que el progrés setmanal de la malaltia es correlaciona positivament amb temperatures mitjanes superiors a 20 °C. El progrés setmanal dels símptomes s'ha explicat mitjançant les equacions de Gompertz, monomolecular i logística, com a models per descriure l'avanç de la incidència de la malaltia. Finalment, en el **Capítol 3** hem desenvolupat un model epidemiològic per predir la dinàmica estacional de l'inòcul aeri de *P. amygdalinum* en funció de variables meteorològiques acumulades. La integració del model en un sistema de suport a la presa de decisions, per determinar l'inici i el final del període de protecció, ha permès reduir el nombre de tractaments fitosanitaris entre un 46 % i un 68 %, en comparació amb l'estratègia tradicional amb aplicacions periòdiques, amb una lleugera disminució en el control de la malaltia. Els resultats d'aquesta tesi representen un pas important en l'optimització del maneig de la taca ocre de l'ametller i contribueixen al desenvolupament d'una estratègia de control més específica i sostenible.



## Resumen

La mancha ocre del almendro, causada por el hongo ascomiceto *Polystigma amygdalinum*, es actualmente una de las enfermedades foliares más importantes de este cultivo en la cuenca mediterránea y particularmente en España. La expansión del cultivo del almendro a nuevos emplazamientos, así como el desafío de intensificar el modelo de producción, se relaciona con el aumento en la incidencia de esta enfermedad en las últimas décadas. Entre las posibles estrategias de control de la mancha ocre, la aplicación periódica de fungicidas es actualmente la práctica más utilizada. Sin embargo, el uso indiscriminado de fungicidas tiene un impacto negativo en el medio ambiente, así como en la salud humana, motivo por el cual se recomienda limitar su empleo a los niveles estrictamente necesarios.

La presente tesis doctoral se plantea con el objetivo de optimizar el control de la mancha ocre del almendro a partir del estudio de la epidemiología de *P. amygdalinum* y su modelización. En primer lugar, en el **Capítulo 1** hemos evaluado la eficacia de una amplia gama de fungicidas para el control de la enfermedad, así como diversas estrategias de aplicación. Los resultados muestran una mayor eficacia de los productos sistémicos, en comparación con los productos de contacto. La incorporación de un criterio meteorológico para programar las aplicaciones fungicidas resulta en una eficacia en el control de la mancha ocre similar a la obtenida con la estrategia tradicional con aplicaciones periódicas, al mismo tiempo que reduce notablemente el número total de tratamientos. Para contribuir a la mejora en el conocimiento de la epidemiología del patógeno, en el **Capítulo 2** hemos monitorizado el inóculo aéreo de *P. amygdalinum* durante tres temporadas de cultivo, mediante técnicas moleculares de PCR cuantitativa. Los resultados muestran que, en las condiciones de cultivo del almendro en la zona de Lleida, la presencia de ascosporas aerovagantes se correlaciona positivamente con las temperaturas medias suaves, entre 10 y 20 °C, así como con variables relacionadas con la humedad y la precipitación. Así mismo, se ha observado que el progreso semanal de la enfermedad se correlaciona positivamente con las temperaturas medias superiores a 20 °C. El progreso semanal de los síntomas ha sido explicado mediante las ecuaciones de Gompertz, monomolecular y logística, como modelos para describir el avance de la incidencia de la enfermedad. Finalmente, en el **Capítulo 3** hemos desarrollado un modelo epidemiológico para predecir la dinámica estacional del inóculo aéreo de *P. amygdalinum* en función de variables meteorológicas acumuladas. La integración del modelo en un sistema de apoyo a la toma de decisiones, para determinar el inicio y el final del período de protección, ha permitido reducir el número total de aplicaciones entre un 46 % y un 68 %, comparado con la estrategia tradicional de aplicaciones periódicas, con una ligera disminución en el control de la enfermedad. Los resultados de esta tesis representan un paso importante en la optimización del manejo de la mancha ocre del almendro y contribuyen al desarrollo de una estrategia de control más específica y sostenible.





## Abstract

Red leaf blotch of almond, caused by the ascomycete *Polystigma amygdalinum*, is currently one of the most important foliar diseases affecting almond crops in the Mediterranean basin, particularly in Spain. In recent decades, its incidence has worryingly increased, which has been associated with the expansion of almond plantations to new locations, as well as with the change towards more intensive production models. Among the possible approaches to control almond red leaf blotch, the periodic application of fungicides is currently the most commonly used practice. Nevertheless, the indiscriminate use of fungicides has a negative impact on the environment and human health, so it is recommended to limit their usage to strictly necessary levels.

This PhD thesis aimed to optimize the control of almond red leaf blotch through the study of *P. amygdalinum* epidemiology and its modelling. First, in **Chapter 1** we evaluated the efficacy of a wide range of fungicide products for the control of the disease, as well as different application strategies. Our results demonstrate that systemic products perform better against red leaf blotch than contact products. When a meteorological criterion is further incorporated into the fungicide application programming, this results in a control efficacy similar to that obtained with the traditional strategy with periodic applications, while the total number of required applications is notably reduced. To expand the knowledge of the pathogen's epidemiology, in **Chapter 2** the airborne inoculum of *P. amygdalinum* was monitored using molecular methods (quantitative PCR) over three growing seasons. Under the almond-growing conditions of Lleida, NE Spain, positive correlations between the presence of airborne ascospores and mild average temperatures, between 10 and 20 °C, were observed, as it occurred with variables related to humidity and precipitation. Likewise, positive correlations were observed between the weekly disease progress and average temperatures higher than 20 °C. To describe the disease progress over time, Gompertz, monomolecular and logistic equations were used to model the weekly progress of red leaf blotch incidence. Finally, in **Chapter 3** we developed an epidemiological model to predict the seasonal dynamics of *P. amygdalinum* airborne inoculum based on accumulated meteorological variables. The integration of this model into a decision support system to set the duration of the protection period has made possible to reduce the number of fungicide applications by 46% to 68%, as compared to the traditional strategy with calendar-based periodic applications, which resulted in a low decrease in control efficacy. The findings of this PhD thesis mean an important advance in optimizing the management of almond red leaf blotch disease, while contribute towards the use of more sustainable and specific control strategies.



## **Introducció general**

---



### L'ametller

#### Taxonomia i aspectes generals

L'ametller (*Prunus amygdalus* Batsch) és un arbre caducifoli pertanyent al gènere *Prunus* i a la família *Rosaceae*. Aquesta família d'angiospermes comprèn fins a 100 gèneres i 3.000 espècies d'una gran diversitat morfològica, moltes d'elles amb un alt interès econòmic pel consum dels seus fruits, però també pels usos ornamentals, forestals o medicinals (Hummer i Janick, 2006). El gènere *Prunus* s'inclou dins de la subfamília *Amygdaloideae*, caracteritzada per desenvolupar fruits de tipus drupa, definits per la presència d'un endocarpi lignificat que envolta la llavor (Liu *et al.*, 2020). Dins d'aquest gènere s'inclouen algunes espècies de gran importància econòmica com el cirerer (*Prunus avium* (L.) L.), la prunera europea (*Prunus domestica* L.), l'albercoquer (*Prunus armeniaca* L.) o el presseguer (*Prunus persica* (L.) Batsch). Aquestes espècies es caracteritzen per formar fruits amb un mesocarpi gruixut, sucós i comestible que envolta l'endocarpi lignificat, i són conegudes popularment amb el nom de fruits de pinyol. L'ametller, en canvi, presenta la particularitat que el mesocarpi no és carnós (en seria la pellofa), de manera que la part comestible (l'ametlla) és la llavor situada dins de l'endocarpi lignificat (la closca). Així doncs, l'ametller es considera una fruita seca i no una fruita de pinyol. Malgrat *P. amygdalus* és actualment l'únic nom vàlid per l'ametller segons l'International Plant Names Index (IPNI, 2023), alguns sinònims corresponents a noms anteriorment acceptats, i encara força usats, són *Prunus dulcis* D.A. Webb o *Amygdalus communis* L.

L'ametller es cultiva principalment per l'obtenció de la seva llavor, l'ametlla, que n'és l'única part comestible i que avui en dia es considera una de les fruites seques econòmicament més importants a escala mundial. En destaca la seva notable versatilitat gastronòmica, ja que les ametlles es poden consumir crues o processades, i s'usen com a ingredient en múltiples productes alimentaris. La farina d'ametlla i la beguda vegetal d'ametlla també han esdevingut populars en els últims anys, per ser alternatives sense gluten ni lactosa, així com una possible font de proteïna en dietes vegetarianes o veganes (Tomishima *et al.*, 2022). L'oli d'ametlla també té múltiples aplicacions, tant en l'àmbit alimentari com en la indústria farmacèutica i cosmètica, degut a la seva alta capacitat hidratant i antiinflamatòria, així com per la seva elevada tolerabilitat. La pellofa i la closca de l'ametlla es consideren subproductes del cultiu, i s'utilitzen principalment en el sector ramader (en l'alimentació o com a llit del bestiar, respectivament) i com a biocombustible per a la producció d'energia (Socias i Company i Gradziel, 2017; Tomishima *et al.*, 2022).

En termes nutricionals, les ametlles són riques en àcids grassos insaturats, proteïnes, carbohidrats (fibra dietètica), vitamines (E i B2), minerals i metabòlits secundaris (Barreca *et al.*, 2020). Es consideren un aliment nutricèutic i són moltes les propietats terapèutiques associades al seu consum, conegudes i utilitzades des de l'antiguitat en la medicina tradicional persa però també en la fitoteràpia moderna. Entre les activitats farmacològiques hi trobem efectes prebiòtics, antioxidants, antimicrobians, antiinflamatoris, anticancerígens, hepatoprotectors, protectors cardiometabòlics, nootròpics, ansiolítics i sedants-hipnòtics (Karimi *et al.*, 2021).

## **El cultiu de l'ametller en l'actualitat**

### *Origen i millora genètica*

La domesticació de l'ametller s'inicià fa 5.000 anys al Creixent Fèrtil, des d'on es disseminà a la regió mediterrània i al sud-oest i centre d'Àsia, zones on es considera un cultiu tradicional (Delplancke *et al.*, 2013; Velasco *et al.*, 2016). No fou fins al segle XIX que s'estengué arreu del món, consolidant-se principalment en aquelles regions de clima mediterrani, com Califòrnia, Austràlia, Sudàfrica o Xile (Kester *et al.*, 1991). En aquestes regions, els programes de millora genètica han estat eines fonamentals per al desenvolupament de noves cultivars d'ametller amb característiques agronòmiques millorades i adaptades a les diferents condicions de cultiu i necessitats del sector (Pérez de los Cobos *et al.*, 2021).

A Espanya, les cultivars 'Marcona' i 'Desmayo Largueta' han estat tradicionalment les més plantades i valorades pel seu rendiment agronòmic i qualitats organolèptiques (Socias i Company i Gradziel, 2017). Tanmateix, ambdues cultivars són de floració primerenca, característica que les fa susceptibles a les gelades primaverals. A més, són autoincompatibles, un caràcter indesitjable agronòmicament ja que la producció de fruits requereix de pol·linització creuada amb altres cultivars. En aquest sentit, els programes de millora genètica de l'ametller de la zona mediterrània, entre els quals destaquen el programes espanyols del CEBAS-CSIC (Regió de Murcia), el CITA (Aragó) i l'IRTA (Catalunya) han tingut com a objectiu comú l'obtenció de cultivars de floració tardana i autofèrtils (Pérez de los Cobos *et al.*, 2021).

La cultivar 'Guara', seleccionada pel CITA l'any 1987, fou la primera cultivar autofèrtil i de floració tardana desenvolupada a Espanya. Aquest fet contribuï a la seva popularitat i l'ha posicionat com la cultivar més plantada en les últimes dècades al nostre país, independentment del model de producció (Dicenta *et al.*, 2015). Avui dia encara és la cultivar més habitual, i el 2021 representà un 30 % i un 22 % de la superfície d'ametller en secà i regadiu, respectivament (MAPA, 2023a). En les noves plantacions d'ametller realitzades

entre el 2018 i el 2021, en canvi, la cultivar 'Lauranne'/'Avijor' (seleccionada pel programa de l'INRA, a França) és la predominant i ocupa un 37 % i un 48 % de la superfície en secà i regadiu, respectivament. Altres cultivars que estan guanyant terreny en les noves plantacions en regadiu són 'Penta' (del CEBAS-CSIC) i 'Marinada' (de l'IRTA) (MAPA, 2023a).

Arreu del món, podem destacar els programes públics de millora genètica de l'ametller que es duen a terme a Califòrnia (UCD-USDA) i Austràlia (Universitat d'Adelaida), que inclouen com a principals objectius l'adaptació local, la qualitat dels fruits i l'autocompatibilitat de les cultivars, entre d'altres. En aquestes regions productores, les cultivars predominants són 'Nonpareil' i 'Carmel', les quals es caracteritzen per tenir la closca tova, en contrast amb la duresa típica de la closca de les cultivars mediterrànies (Socias i Company i Gradziel, 2017).

### Producció

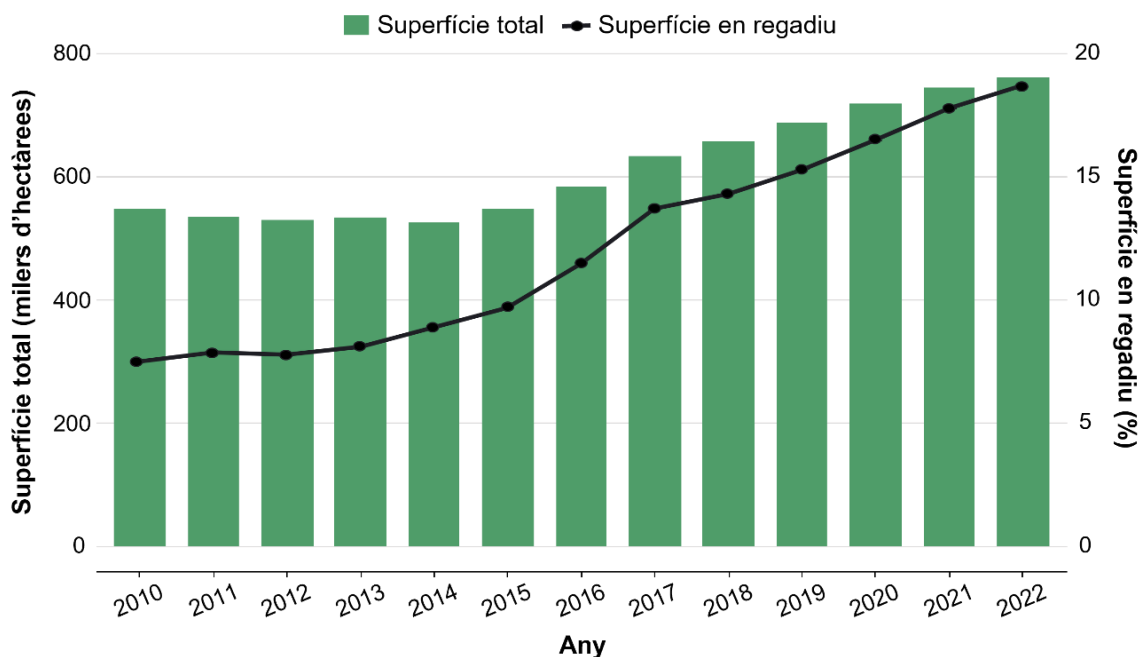
L'ametller és considerat un dels cultius de fruita seca més rellevants a escala internacional. Segons l'Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació (FAO), el 2021 la producció mundial d'ametlles amb closca fou de 3.993.998 tones, provinents principalment dels Estats Units d'Amèrica (55 %), seguit per Espanya (9 %) i Austràlia (7 %) (FAO, 2023). La producció mundial d'aquesta fruita seca ha experimentat un notable creixement en les últimes dècades, amb un augment del 157 % entre els anys 2001 i 2021, el que posa en evidència l'increment continuat en la seva demanda.

Segons les dades històriques, en els darrers 50 anys (1972-2021) Espanya ha liderat el rànquing de països amb més superfície dedicada al cultiu de l'ametller, amb 744.470 ha el 2021 (FAO, 2023; MAPA, 2023c). Tanmateix, pel que fa al rendiment, Espanya obtingué un valor de 491 kg/ha el 2021, xifra que contrasta enormement amb l'obtinguda en altres països líders en la producció d'ametlles, com són els Estats Units d'Amèrica i Austràlia, on el 2021 es donaren rendiments de 4.098 i 5.609 kg/ha, respectivament. Aquesta gran diferència es deu al caràcter marginal tradicionalment associat al cultiu de l'ametller en la zona mediterrània, relegat a sòls poc productius, de secà, amb marcs de plantació molt amplis, un maneig mínim i mantenint cultivars tradicionals, que són menys productives. En canvi, l'obtenció d'alts rendiments està associada a la implementació del regadiu, a l'adopció de models de producció intensius altament tecnificats i a l'ús de material vegetal millorat (portaempelts de baix vigor i cultivars de floració tardana i autofèrtils) (Miarnau *et al.*, 2018).

A Espanya, la superfície agrícola dedicada al cultiu de l'ametller es distribueix principalment entre les comunitats autònomes d'Andalusia (31,5 %), Castella-la Manxa (20,2 %), la Comunitat Valenciana (12,4 %), Aragó (11,6 %) i la Regió de Múrcia (11,1 %) (MAPA, 2023c). Malgrat la major part d'aquesta superfície continua sent de secà, en l'última



dècada s'ha observat un increment tant en la superfície dedicada al ametller com en la proporció d'aquesta que es troba en règim de regadiu, que el 2022 representà un 18,7 % del total (Figura 1).



**Figura 1:** Superfície total dedicada al cultiu de l'ametller (en columnes) i proporció en regadiu (línia de punts) a Espanya entre els anys 2010 i 2022 (MAPA, 2023c).

El 2021, Catalunya destinava 40.943 ha al cultiu de l'ametller, el que representa un 5,5 % de la superfície d'ametllers d'Espanya i un 7,2 % de la seva producció anual total. Aquesta superfície es distribueix principalment en les províncies de Lleida i Tarragona (ambdues amb un 49,2 %). Un 31,1 % de la superfície es troba en règim de regadiu, proporció que ha anat augmentant any rere any en la darrera dècada, clarament superior a la mitjana estatal (MAPA, 2023c).

### *Reptes i perspectives de futur*

Actualment, el cultiu de l'ametller està sotmès una transició progressiva cap a models de producció més intensius arreu del món, i en especial per part dels productors d'ametlla espanyols, on encara predomina el model de cultiu tradicional i de secà. D'aquesta forma, es pretén afrontar el repte de millorar el rendiment i la rendibilitat d'aquest cultiu (Miarnau *et al.*, 2018). No obstant, aquesta transició no està exempta de preocupacions i desafiaments. Per una banda, el context actual d'escalfament global i emergència climàtica exigeix l'optimització de les estratègies de cultiu per fer front a l'escassetat hídrica, cada cop més habitual en les regions semi-àrides de la conca Mediterrània (Ercin *et al.*, 2021; Montsant *et al.*, 2021; Mirás-Avalos *et al.*, 2023). Aquesta situació requereix l'adopció de pràctiques de gestió de l'aigua eficients i la utilització de tecnologies de reg innovadores en les noves

plantacions en règim de regadiu, així com la selecció i desenvolupament de cultivars d'ametller resistents a la sequera. D'aquesta manera es cerca garantir un ús sostenible dels recursos hídrics disponibles i afrontar les possibles restriccions.

D'altra banda, la intensificació del cultiu ha comportat l'emergència de noves malalties i plagues; entre aquestes destaquem la vespeta de l'ametller (*Eurytoma amygdali*), la taca bacteriana (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) i el xancre escumós (d'agent causal desconegut) (Torguet *et al.*, 2016; López-Moral *et al.*, 2020). Així mateix, les noves condicions també han afavorit l'augment en la incidència d'algunes malalties ja existents, com és el cas de l'antracnosi (*Colletotrichum* spp.) i la taca ocre de l'ametller (*Polystigma amygdalinum*). Aquesta darrera malaltia és l'objecte d'estudi de la present tesi doctoral.

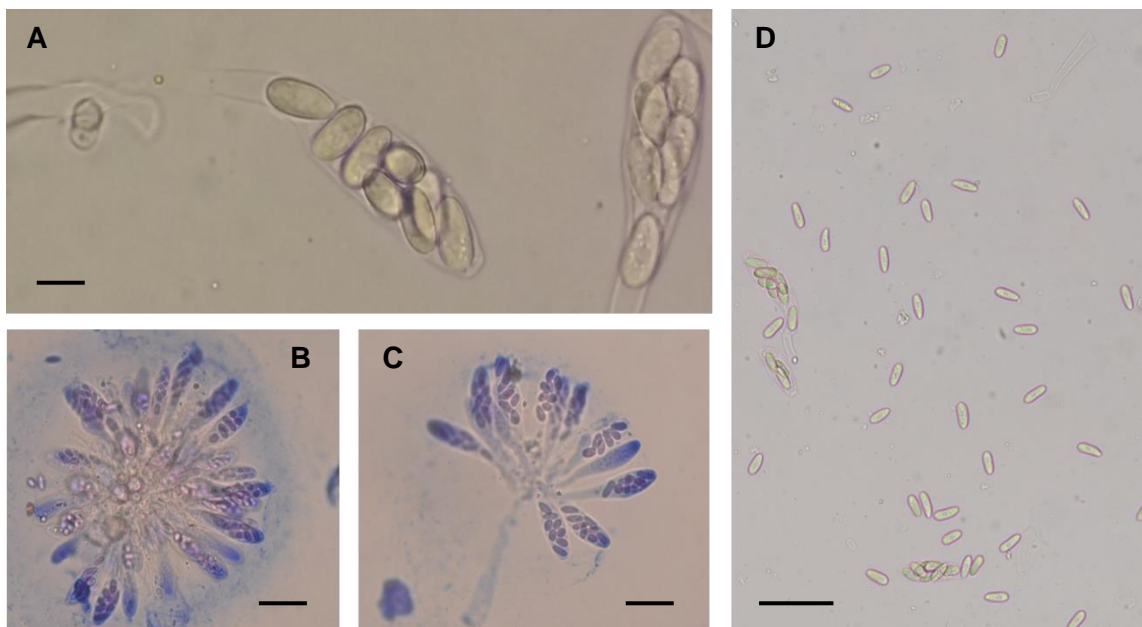
## La taca ocre de l'ametller

### ***Polystigma amygdalinum*: taxonomia i aspectes generals**

La taca ocre de l'ametller està causada pel fong ascomicet *P. amygdalinum* P.F. Cannon. La malaltia es descrigué per primera vegada el 1843 a França, en fulles d'ametller, i el patogen es classificà com a *Septoria rubra* var. *amygdali* Desm. (Desmazières, 1843), una subespècie de *S. rubra* (actualment *Polystigma rubrum* (Pers.) DC.). *Polystigma rubrum* és un patogen que també pot afectar altres espècies del gènere *Prunus*. Posteriorment es reubicà en el gènere *Polystigma* com a *P. ochraceum* (Fr.) Sacc. (sinònim de *P. fulvum* Pers. ex DC.), i Paul F. Cannon el 1996 el diferencià d'altres espècies de *Polystigma* anomenant-lo específicament *P. amygdalinum* (Cannon, 1996). En aquest mateix estudi, Cannon descrivia un total de cinc espècies de *Polystigma*, caracteritzades totes elles per desenvolupar estromes brillants i acolorits en fulles vives de diferents espècies del gènere *Prunus* pròpies de la regió Euro-Asiàtica. El gènere *Polystigma* s'incloué dins la família *Phyllachoraceae* i l'ordre *Phyllachorales* (Cannon, 1996). Aquesta classificació taxonòmica de *P. amygdalinum* es manté avui en dia en les principals bases de dades de taxonomia fúngica, com Index Fungorum (<https://www.indexfungorum.org/>) o Mycobank (<https://www.mycobank.org/>). Tanmateix, el debat en relació a la seva posició taxonòmica ha continuat en l'última dècada. A partir d'anàlisis filogenètiques, Habibi *et al.* (2015) i Mardones *et al.* (2017) proposaren la reubicació de *P. amygdalinum* en l'ordre *Xylariales*, subclasse *Xylariomycetidae*. Així mateix, Dayarathne *et al.* (2017) suggeriren recuperar la família *Polystigmataceae*, també dins de la subclasse *Xylariomycetidae*, per incloure aquells ascomicets paràsits obligats de fulles o brots de rosàcies i amb *Polystigma* com a gènere tipus.

*Polystigma amygdalinum* es caracteritza per l'especificitat per l'ametller com a hoste i per les seves característiques morfològiques (Cannon, 1996). Els ascis (74-97 x 18-23 µm)

són claviformes i tenen el peu curt, la paret molt fina, un anell apical, l'apex entre obtús i truncat, i habitualment contenen vuit ascòspores en disposició biseriada. Les ascòspores (13-16,5 x 5,5-6,5 µm) són hialines, llises, aseptades, de forma cilíndrica, amb un extrem arrodonit i l'altre entre obtús i agut, sovint lleugerament més estretes en la regió central i de parets fines no gelatinoses (Figura 2).



**Figura 2:** Imatges de microscòpia òptica de *Polystigma amygdalinum*: A) ascus octosporats madurs (escala = 10 µm), B) i C) grups d'ascus madurs en tinció de blau tripà (escala = 50 µm); D) ascòspores (escala = 50 µm). Fotografies: Erick Zúñiga, IRTA.

*Polystigma amygdalinum* ha estat considerat un patogen biòtrof durant dècades, per la necessitat de desenvolupar-se sobre teixits vegetals vius i la dificultat per ser cultivat en medis de cultiu artificials (Cannon, 1996; Habibi i Banihashemi, 2015). Tanmateix, Zúñiga *et al.* (2019 i 2020) han proposat recentment la consideració de *P. amygdalinum* com a patogen hemibiòtrof, tenint en compte la dualitat del seu cicle biològic, que alterna una fase biòtrofa –en les fulles vives de l'ametller– amb una fase necròtrofa, en la que el patogen provoca la necrosi foliar i continua el seu cicle en la fullaraca.

Tradicionalment, la identificació i la caracterització de *P. amygdalinum* s'han basat en el reconeixement dels seus símptomes en l'ametller i en l'observació de les ascòspores i d'altres estructures reproductives mitjançant observacions microscòpiques, en base a les característiques morfològiques descrites més amunt. Darrerament s'ha posat a punt un mètode per detectar i quantificar *P. amygdalinum* mitjançant tècniques moleculars, concretament per PCR quantitativa (qPCR) amb encebadors específics, el que contribueix a una detecció ràpida del patogen fins i tot en els estadis primerencs de la malaltia (Zúñiga *et al.*, 2018).

## Distribució geogràfica

La malaltia de la taca ocre de l'ametller es troba distribuïda principalment a països de la conca mediterrània i de l'Orient Mitjà. Concretament, ha estat descrita a Afganistan, Espanya, França, Grècia, Índia, Iran, Israel, Itàlia, Kazakhstan, Líban, Líbia, Marroc, Portugal, Romania, Tadjikistan, Turquia, Ucraïna i Xipre (Desmazières, 1843; Cannon, 1996). En contrast, avui en dia encara no s'ha informat d'aquesta malaltia als Estats Units d'Amèrica o Austràlia, dos dels principals països líders en la producció d'ametlla a escala mundial (Farr i Rossman, 2022).

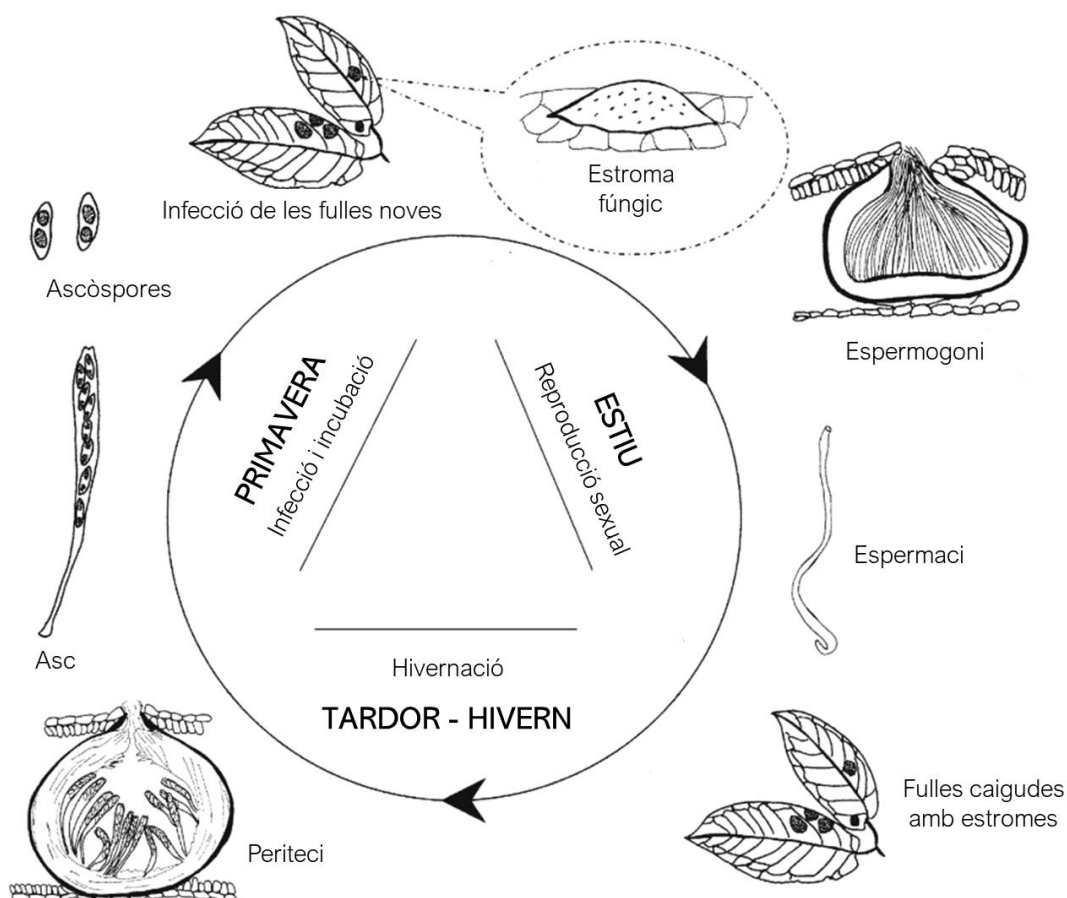
La taca ocre està àmpliament estesa per Espanya, i és particularment predominant a la part meridional del país, a la costa mediterrània i a la vall de l'Ebre (Egea *et al.*, 1984; Tuset i Portilla, 1987; Ollero-Lara *et al.*, 2019; Miarnau *et al.*, 2021). La seva incidència ha augmentat en les últimes dècades, i avui dia és una de les micosis de la part aèria més preocupants en el cultiu de l'ametller (Torguet *et al.*, 2019). Aquest augment s'associa a la ubicació de les noves plantacions en zones d'interior, on les condicions climàtiques són més idònies pel desenvolupament de la malaltia. A més a més, aquestes noves plantacions es dissenyen sota models intensius de producció que inclouen reg i una alta densitat de plantació, així com la selecció de cultivars que ofereixen característiques agronòmiques interessants, com la floració tardana i l'autofertilitat, però que són especialment susceptibles a la taca ocre (Miarnau *et al.*, 2021).

## Cicle biològic i simptomatologia

El cicle biològic de *P. amygdalinum* es pot explicar conjuntament amb els diferents estadis del cicle fenològic anual de l'ametller. El patogen passa l'hivern en les fulles infectades i caigudes al terra en la temporada anterior, on els peritecis –formats a l'estroma foliar– maduren i s'hi desenvolupen les ascòspores. A la primavera, en condicions meteorològiques favorables, les ascòspores s'alliberen i es disseminen per l'aire, entrant en contacte amb les fulles noves de l'ametller (Banihashemi, 1990; Cannon, 1996; Saad i Masannat, 1997). Sobre les fulles, les ascòspores germinen i penetren en el teixit vegetal, el que dona pas a la infecció i al desenvolupament de l'estroma fúngic foliar (Figura 3).

L'expressió dels símptomes s'inicia després d'un període d'incubació relativament llarg i variable, que eventualment pot ser de fins a 10 setmanes (Banihashemi, 1990; Saad i Masannat, 1997; Amanifar, 2017; Zúñiga *et al.*, 2020). Els símptomes primerencs consisteixen en l'aparició de taques cloròtiques, visibles en ambdues cares de les fulles, inicialment grogues però que s'enfosqueixen progressivament cap a tonalitats ocre i finalment molt fosques, al mateix temps que la superfície de les taques augmenta i el teixit

es necrosa (Figura 4). A mesura que l'estiu avança, les taques poden ocupar la totalitat de la superfície foliar, que sovint presenta hipertròfia i deformació pel desenvolupament de l'estroma fúngic.

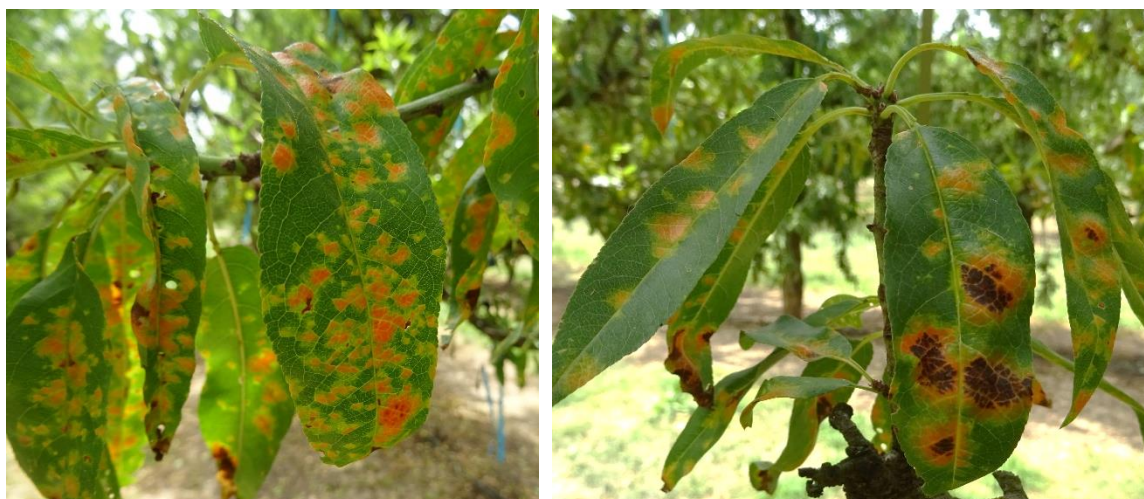


**Figura 3:** Cicle biològic de *Polystigma amygdalinum* en fulles d'ametller (*Prunus amygdalus*). Modificat de Suzuki *et al.* (2008).

Malgrat la taca ocre no produeix la mort dels ametllers afectats, en redueix la seva capacitat fotosintètica i provoca una defoliació prematura, tot debilitant l'arbre de manera que la producció d'ametlles en la temporada present, però també en les posteriors, es pot veure compromesa (Cannon, 1996; López-López *et al.*, 2016). Tot i així, els danys en termes agronòmics associats a la presència de la taca ocre no han estat quantificats ara per ara.

A l'estiu, en el teixit estromàtic es desenvolupen el que inicialment es consideraven picnidis i picnidiòspores (Banihashemi, 1990; Saad i Masannat, 1997), unes espores filiformes la funció de les quals fou investigada per Habibi i Banihashemi (2016). En aquest estudi, es confirmà que no són capaces de germinar *in vitro* o *in vivo*, ni tampoc de produir infeccions secundàries, el que portà els autors a concloure que els suposats picnidis i picnidiòspores són en realitat espermogonis i espermacis, estructures haploides amb un paper en la reproducció sexual i necessàries per iniciar la formació dels peritecis (aquests ja

dicariòtics). El desenvolupament dels peritecis esdevé més endavant en la fullaraca, a mesura que avança la tardor i l'hivern, i dona lloc a la nova generació d'ascs i ascòspores. Així doncs, la inexistència de cicles secundaris d'infecció implica que les ascòspores siguin l'única forma d'inòcul de *P. amygdalinum* i que la taca ocre es consideri una malaltia monocíclica.



**Figura 4:** Síntomes de la taca ocre de l'ametller, causada per *Polystigma amygdalinum*. Fotografies: Gemma Pons-Solé.

## Epidemiologia

En patologia vegetal, l'epidemiologia es defineix com la ciència que estudia el desenvolupament de les malalties en les poblacions vegetals, amb l'objectiu de determinar els factors que influeixen en les diferents etapes del cicle biològic del patogen (Madden *et al.*, 2007). En el cas de la taca ocre de l'ametller, el paper de les condicions meteorològiques en el cicle biològic de *P. amygdalinum*, així com en el desenvolupament de la malaltia, ha estat estudiat amb certes dificultats. De fet, la impossibilitat de fer créixer el patogen en medis de cultiu artificials representa un repte per al seu estudi i comporta que bona part de la recerca sobre la seva epidemiologia es basi directament en dades obtingudes en assaigs de camp. Aquesta aproximació empírica pot ser útil per identificar i descriure les relacions, expressades matemàticament, entre certa fase del patogen i les condicions meteorològiques observades. Aquestes relacions, però, no necessàriament impliquen causalitat i són difícilment extrapolables a d'altres contextos geogràfics o agrícoles (Rossi *et al.*, 2010).

Les condicions meteorològiques de la tardor i l'hivern semblen tenir un paper important en la supervivència del patogen i en la formació de l'inòcul en el cicle anual de la malaltia. Ghazanfari i Banihashemi (1976) afirmaren que un període de temperatura baixa (<10 °C) és un requisit necessari pel desenvolupament i la maduració dels peritecis. Així mateix, la disponibilitat d'aigua i la temperatura entre els mesos d'octubre i de gener es

correlacionen positivament amb la quantitat d'inòcul potencial, és a dir, amb les ascòspores madures presents a la fullaraca en la temporada següent (Zúñiga *et al.*, 2020). Malgrat les ascòspores madures es troben potencialment disponibles en la fullaraca entre els mesos de gener i agost (Zúñiga *et al.*, 2020), el seu alliberament es dona principalment en els mesos de primavera, el que sembla suggerir una relació amb la precipitació d'aquest període. Aquest fet coincideix amb la caiguda dels pètals i l'aparició de les primeres fulles de l'any (Banihashemi, 1990; Saad i Masannat, 1997). En els fongs ascomicets, la disponibilitat d'aigua es considera clau per a l'alliberament de les ascòspores, ja que contribueix a generar la pressió necessària dins dels ascus per provocar un alliberament forçat o explosiu de les ascòspores (Trail, 2007).

En relació a la germinació de les ascòspores, la temperatura té un efecte rellevant en aquest procés, així com en la posterior formació dels apressoris (Habibi i Banihashemi, 2015). Ambdós processos, la germinació de les ascòspores i la formació dels apressoris, poden desenvolupar-se a temperatures d'entre 5 i 20 °C, malgrat la temperatura òptima per la germinació és de 10 °C. A temperatures superiors a 20 °C, s'observa la distorsió del contingut cel·lular i la inhibició de la formació dels apressoris (Habibi i Banihashemi, 2015). El procés infectiu es dona principalment a la primavera, quan les temperatures mitjanes oscil·len entre els 10 i els 20 °C (Zúñiga *et al.*, 2020).

Un cop ocorreguda la infecció, els símptomes de la malaltia es manifesten després d'un període d'incubació variable, d'entre 30 i 40 dies a l'Orient Mitjà (Banihashemi, 1990; Saad i Masannat, 1997; Amanifar, 2017), però que, al nostre país, pot oscil·lar entre 2 i 12 setmanes segons les condicions de temperatura i l'època de l'any (Zúñiga *et al.*, 2020). Els primers símptomes apareixen entre principi de maig i la primera quinzena de juny, fet que s'ha observat tant a l'Orient Mitjà com a Espanya (Banihashemi, 1990; Miarnau *et al.*, 2021). Tant la incidència (proporció de fulles afectades) com la severitat (proporció de superfície foliar afectada) augmenten veloçment durant el mes de juny, mentre que la taxa de progressió de la malaltia disminueix o roman estable durant els mesos de juliol i agost (Saad i Masannat, 1997; Miarnau *et al.*, 2021). La incidència de la taca ocre pot variar anualment i ha estat correlacionada positivament amb la pluja acumulada a la primavera, mentre que la correlació és negativa amb les altes temperatures a la primavera i a l'estiu (Miarnau *et al.*, 2021).

Així doncs, la informació disponible actualment sobre la influència de les condicions ambientals en el cicle biològic de *P. amygdalinum* es limita a determinades etapes del cicle, i sovint presenta un fort lligam amb el context geogràfic d'on s'han obtingut les dades, per la naturalesa empírica dels estudis. Un coneixement més profund de l'epidemiologia del patògen i la seva modelització pot obrir les portes a desenvolupar una estratègia de control

que garanteixi la protecció a la taca ocre d'una manera adaptada i optimitzada (De Wolf i Isard, 2007; Rossi *et al.*, 2010).

## Control

Tradicionalment, el control de la taca ocre de l'ametller ha estat basat en tres aproximacions (Almacellas, 2014): 1) l'aplicació de fungicides per evitar o frenar les infeccions noves, 2) l'ús de cultivars d'ametller tolerants a la malaltia, i 3) la realització de pràctiques agrícoles per reduir la quantitat de l'inòcul primari.

### *Tractaments fungicides*

En el control de les malalties i plagues vegetals, habitualment s'ha recorregut a l'aplicació periòdica de pesticides per mantenir els cultius protegits i assegurar-ne la viabilitat econòmica. En l'àmbit dels fungicides, i en funció del seu mode d'acció envers el patogen, podem distingir entre els fungicides preventius, els curatius i els erradicatius (Caffi i Rossi, 2018). Els fungicides preventius s'apliquen abans o durant el període d'infecció, i disminueixen la taxa de germinació de les espores o la eficiència de la infecció en el teixit vegetal. Els fungicides curatius, en canvi, s'apliquen entre la infecció i l'aparició dels símptomes, ja que inhibeixen el desenvolupament del fong. Per últim, els productes erradicatius s'apliquen en presència dels símptomes de la malaltia, i persegueixen evitar la producció d'inòcul secundari (en el cas de les malalties policíclics). Quant a la seva localització en la planta, podem distingir entre els fungicides de contacte, que romanen sobre la superfície de la planta i només són efectius quan entren en contacte directe amb el fong, i els fungicides sistèmics o penetrants, que s'absorbeixen a través de la cutícula vegetal i que es distribueixen pels diferents teixits de la planta, oferint així una protecció més completa (Caffi i Rossi, 2018).

En el cas de la taca ocre de l'ametller, l'eficàcia de diferents productes fungicides ha estat avaluada principalment a Iran (Banihashemi, 1990; Bayt Turk *et al.*, 2014; Amanifar, 2017) i Espanya (Miarnau *et al.*, 2021). A Iran, els estudis compararen fungicides sistèmics i no sistèmics, i coincidiren en destacar la triforina com el producte més efectiu en la reducció de la incidència i la severitat de la malaltia. La triforina és un fungicida sistèmic pertanyent al grup FRAC 3 (inhibidors de la desmetilació) (FRAC, 2022). Altres fungicides significativament eficaços foren els de contacte, com el mancozeb i alguns productes de base cúprica (l'oxiclorur de coure, l'hidròxid de coure i el brou bordelès). Aquests estudis proposen programar un total de tres aplicacions, la primera durant la caiguda dels pètals i les dues posteriors amb cadència quinzenal. A Espanya, tenint en compte que algunes de les cultivars d'ametller més plantades en les últimes dècades, com 'Guara' i 'Marinada', són altament susceptibles a la taca ocre, l'aplicació de fungicides continua sent una pràctica



habitual i necessària per controlar aquesta malaltia i garantir la viabilitat econòmica de les noves plantacions (Miarnau *et al.*, 2021). Els productes fungicides actualment registrats pel control de la taca ocre de l'ametller són tres: el difenoconazol 25 %, la combinació de kresoxim-metil 25 % i difenoconazol 12,5 % i la combinació de piraclostrobina 6,7 % i boscalida 26,7 % (MAPA, 2023b). D'entre aquestes substàncies actives, el difenoconazol pertany al grup FRAC 3 (inhibidors de la desmetilació), la boscalida al grup FRAC 7 (inhibidors de la succinat deshidrogenasa) i la piraclostrobina i el kresoxim-metil al grup FRAC 11 (inhibidors de la quinona externa) (FRAC, 2022). Tots ells són fungicides sistèmics i poden usar-se amb finalitats preventives o curatives.

Tenint en compte que, per norma general, l'ús excessiu o inadequat dels fungicides pot conduir a l'aparició del fenomen de la resistència entre els fongs patògens, és important seguir les pràctiques recomanades dins el marc de la gestió integrada de plagues (GIP o IPM, de l'anglès *Integrated Pest Management*), una important alternativa a la gestió tradicional de plagues i malalties que se centra en la prevenció i en minimitzar l'ús de pesticides (Brent i Hollomon, 2007). Recentment, la Comissió Europea, mitjançant el Pacte Verd Europeu i concretament la estratègia 'de la granja a la taula' (*'from farm to fork'*), ha establert com objectiu pel 2030 el reduir a la meitat l'ús de pesticides químics (European Commission, 2020). Així doncs, i en aquest context, és important explorar l'eficàcia de nous productes i de diferents estratègies d'aplicació, així com desenvolupar eines que permetin programar els tractaments fungicides de manera més precisa i efectiva.

En el marc de l'agricultura de precisió, la teledetecció és un recurs prometedor per a la detecció precoç de les malalties, el que pot contribuir a limitar les aplicacions de productes fitosanitaris. En el cas de la taca ocre de l'ametller, López-López *et al.* (2016) demostraren que els índexs de clorofil·la i carotenoides, així com la fluorescència de la clorofil·la, són efectius per a la detecció de la taca ocre en els estadis primerencs del desenvolupament de la malaltia. Així mateix, l'estudi de l'epidemiologia dels agents patògens pot permetre el desenvolupament de models matemàtics que tinguin com objectiu predir els períodes de màxim risc d'infecció en base a les condicions meteorològiques o ambientals (Madden *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2010). Aquests models poden ser integrats en sistemes de suport a la presa de decisions (DSS, de l'anglès *decision support system*), eines útils en l'optimització de la gestió de les malalties vegetals que poden contribuir a reduir el número d'aplicacions de fungicides sense comprometre la protecció del cultiu (Gent *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2019; Lázaro *et al.*, 2021; González-Domínguez *et al.*, 2023). Segons el nostre coneixement, ara per ara no existeixen models epidemiològics per predir el risc d'infecció de *P. amygdalinum*, ni DSS que permetin optimitzar les estratègies d'aplicació de fungicides pel control de la taca ocre.

### *Tolerància de les cultivars a la taca ocre*

Les diferències en la susceptibilitat a la taca ocre entre diferents cultivars d'ametller han estat avaluades en nombroses ocasions, sempre en estudis de camp i amb resultats sovint discordants, possiblement per la variabilitat en les condicions experimentals (Miarnau *et al.*, 2021). A Espanya, Egea *et al.* (1984) avaluaren la susceptibilitat a la taca ocre de 81 cultivars d'ametller i observaren grans diferències entre elles, i constataren que la majoria de les cultivars tradicionals espanyoles, com és el cas de 'Marcona' o 'Blanqueta', són altament susceptibles a la malaltia. Més recentment, Ollero-Lara *et al.* (2019) i Miarnau *et al.* (2021) han avaluat un total de 40 i 21 cultivars, respectivament, tant de tradicionals com obtingudes recentment per diferents programes de millora genètica de l'ametller. Entre aquestes, s'observà que 'Guara' i 'Tarraco' són altament susceptibles a la taca ocre, mentre que 'Vairo' i 'Mardía' són molt tolerants. De manera semblant, la susceptibilitat de les cultivars a la taca ocre també ha despertat interès i ha estat estudiada en altres països on la malaltia és predominant, com Iran (Heydarian i Moradi, 2005) i Itàlia (Bonaccorsi *et al.*, 2010).

Malgrat avui en dia no es coneixen cultivars d'ametller totalment resistents a la taca ocre, les diferències en el grau de susceptibilitat a aquesta malaltia són notables, de manera que l'elecció de la cultivar pot ser un factor clau en l'establiment de plantacions noves en zones de cultiu on la taca ocre és predominant, de forma que això pot contribuir a la reducció de l'inòcul patogen i disminuir la necessitat de tractaments fungicides (Miarnau *et al.*, 2021).

La recerca de les bases genètiques que expliquin les diferències entre cultivars, pel que fa a la susceptibilitat a la taca ocre, pot permetre el desenvolupament de marcadors moleculars que facilitin la incorporació de la tolerància a la taca ocre com un caràcter més a seleccionar en els programes de millora genètica de l'ametller (Collard *et al.*, 2005). En aquest sentit, Zúñiga *et al.* (2019) determinaren que la deposició de lignina i la regulació diferenciada de diversos gens de defensa en les cultivars 'Tarraco' i 'Mardía' podrien estar en la base d'aquesta susceptibilitat diferenciada. En concret, els seus resultats suggeriren un rol important de la via dels fenilpropanoides en la resposta de defensa contra la infecció de *P. amygdalinum*. Alhora, proposaren que la síntesi primerenca de lignina i la seva deposició en les parets cel·lulars del parènquima foliar podria ser determinant per impedir l'entrada del patogen en les cèl·lules de l'hoste i controlar-ne l'expansió.

### *Tècniques de cultiu per a la reducció de l'inòcul*

Tenint en compte que la taca ocre és una malaltia monocíclica, les pràctiques agrícoles orientades a reduir la quantitat de l'inòcul primari present en la fullaraca han estat tradicionalment recomanades. Amb aquest objectiu i segons diferents autors (Lin i

Sztejnberg, 1993; Cannon, 1996; Almacellas, 2014; Torguet *et al.*, 2019), les principals mesures de control de la fullaraca es basen en: 1) la incineració o l'eliminació física mitjançant els ormejos agrícoles apropiats, i 2) el tractament amb fungicides o altres productes químics, entre els quals és habitual el tractament amb urea cristal·lina per accelerar-ne la descomposició. Tot i això, no existeix actualment informació exhaustiva a la literatura científica pel que fa a l'avaluació d'aquestes pràctiques. Recentment a Espanya s'ha realitzat un estudi per determinar l'efecte de tractaments amb urea o amb fongs saprofítics (*Myrothecium inundatum* Tode i la soca FO12 de *Fusarium oxysporum* Schltdl.) sobre la reducció de l'inòcul de *P. amygdalinum* de la fullaraca (López-Moral *et al.*, 2023). En aquest estudi es confirmà que tractar la fullaraca amb urea cristal·lina redueix de manera significant la producció d'ascòspores. Els mateixos autors també presentaren per primera vegada una alternativa prometedora, permesa també en els sistemes de producció agrícola ecològica, consistent en l'aplicació de suspensions de conidis de *M. inundatum* amb resultats similarmet eficaços als de l'aplicació d'urea.

## Referències

- Almacellas J. (2014) Síntomas, daños y métodos de control de la mancha ocre del almendro. *Vida Rural*, **389**, 28-32.
- Amanifar N. (2017) Evaluation of the efficiency of two fungicides on the control of almond leaf blotch disease on two cultivars in along Zayanderood. *Journal of Plant Protection*, **31**, 166-171.
- Banihashemi Z. (1990) Biology and control of *Polystigma ochraceum*, the cause of almond red leaf blotch. *Plant Pathology*, **39**, 309-315.
- Barreca D., Nabavi S.M., Sureda A., Rasekhian M., Raciti R., Silva A.S., Annunziata G., Arnone A., Tenore G.C., Sutar I., Mandalari G. (2020) Almonds (*Prunus dulcis* Mill. D. A. Webb): a source of nutrients and health-promoting compounds. *Nutrients*, **12**, 672.
- Bayt Tork D., Taherian M., Divan R. (2014) Evaluation of some fungicides for controlling almond red leaf blotch (*Polystigma amygdalinum*). *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, **4**, 1011-1016.
- Bonaccorsi A., Bella P., Catara A. (2010) Gravi infezioni di *Polystigma amygdalinum* su mandorlo in Sicilia orientale. *ATTI Giornate Fitopatologiche*, **2**, 199-200.
- Brent K.J., Hollomon D.W. (2007) *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?*, Brussels: Fungicide Resistance Action Committee.
- Caffi T., Rossi V. (2018) Fungicide models are key components of multiple modelling approaches for decision-making in crop protection. *Phytopathologia Mediterranea*, **57**, 153-169.

- Cannon P.F. (1996) Systematics and diversity of the Phyllachoraceae associated with Rosaceae, with a monograph of *Polystigma*. *Mycological Research*, **100**, 1409-1427.
- Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, **142**, 169-196.
- Dayarathne M.C., Maharachchikumbura S.S.N., Jones E.B.G., Goonasekara I.D., Bulgakov T.S., Al-Sadi A.M., Hyde K.D., Lumyong S., McKenzie E.H.C. (2017) *Neophyllachora* gen nov. (Phyllachorales), three new species of *Phyllachora* from Poaceae and resurrection of *Polystigmataceae* (Xylariales). *Mycosphere*, **8**, 1598–1625.
- De Wolf E.D., Isard S.A. (2007) Disease cycle approach to plant disease prediction. *Annual Review of Phytopathology*, **45**, 203-220.
- Delplancke M., Alvarez N., Benoit L., Espindola A., H I.J., Neuenschwander S., Arrigo N. (2013) Evolutionary history of almond tree domestication in the Mediterranean basin. *Molecular Ecology*, **22**, 1092-1104.
- Desmazières J.B.H.J. (1843) Dixième notice sur quelques plantes cryptogames, la plupart inédites, récemment découvertes en France, et que vont paraître en nature dans la collection publiée par l'auteur. *Annales des Sciences Naturelles, Sér. 2*, **19**, 335-373.
- Dicenta F., Sánchez-Pérez R., Rubio M., Egea J., Batlle I., Miarnau X., Palasciano M., Lipari E., Confolent C., Martínez-Gómez P., Duval H. (2015) The origin of the self-compatible almond 'Guara'. *Scientia Horticulturae*, **197**, 1-4.
- Egea L., García J.E., Egea J., Berenguer T. (1984) Premières observations sur une collection de 81 variétés d'amandier située dans le Sud-Est espagnol. *Options Méditerranéennes: Série Etudes; n. 1984-II*, 13-26.
- Ercin E., Veldkamp T.I.E., Hunink J. (2021) Cross-border climate vulnerabilities of the European Union to drought. *Nature Communications*, **12**, 3322.
- European Commission (2020) Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system. *En. COM(2020) 381 final*.
- FAO (2023) *FAOSTAT*. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO [Online]. Disponible: <https://www.fao.org/faostat/en/#data> [Consulta: 12/01/2023].
- Farr D.F., Rossman A.Y. (2022) *Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA* [Online]. Disponible: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldb/> [Consulta: 30/03/2022].
- FRAC (2022) FRAC Code List ©\*2022: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). Disponible: <https://www.frac.info/knowledge-database/knowledge-database> [Consulta: 16/01/2023].

- Gent D.H., Mahaffee W.F., McRoberts N., Pfender W.F. (2013) The use and role of predictive systems in disease management. *Annual Review of Phytopathology*, **51**, 267-289.
- Ghazanfari J., Banihashemi Z. (1976) Factors influencing ascocarp formation in *Polystigma ochraceum*. *Transactions of the British Mycological Society*, **66**, 401-406.
- González-Domínguez E., Caffi T., Rossi V., Salotti I., Fedele G. (2023) Plant disease models and forecasting: changes in principles and applications over the last 50 years. *Phytopathology*, **113**, 678-693.
- Habibi A., Banihashemi Z. (2015) Ascospore germination and appressorium formation in vitro of *Polystigma amygdalinum* and its survival period. *Iranian Journal of Plant Pathology*, **51**, 461-469.
- Habibi A., Banihashemi Z. (2016) Mating system and role of pycnidiospores in biology of *Polystigma amygdalinum*, the causal agent of almond red leaf blotch. *Phytopathologia Mediterranea*, **55**, 98-108.
- Habibi A., Banihashemi Z., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. (2015) Phylogenetic analysis of *Polystigma* and its relationship to *Phyllachorales*. *Phytopathologia Mediterranea*, **54**, 45-54.
- Heydarian A., Moradi H. (2005) Relative resistance of selected almond cultivars to the causal agent of red leaf blotch disease, in Chahar mahal-va-Bakhtiari province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, **41**, 157-169.
- Hummer K.E., Janick J. (2006) Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. *En: Genetics and Genomics of Rosaceae*, pp. 1-17. Eds Folta K.M. & Gardiner S.E. New York: Springer.
- IPNI (2023) *International Plant Names Index* [Online]. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Herbarium. Disponible: <http://www.ipni.org> [Consulta: 20/03/2023].
- Karimi Z., Firouzi M., Dadmehr M., Javad-Mousavi S.A., Bagheriani N., Sadeghpour O. (2021) Almond as a nutraceutical and therapeutic agent in Persian medicine and modern phytotherapy: A narrative review. *Phytotherapy Research*, **35**, 2997-3012.
- Kester D.E., Gradziel T.M., Grasselly C. (1991) Almonds (*Prunus*). *Acta Horticulturae*, **290**, 701-760.
- Lázaro E., Makowski D., Vicent A. (2021) Decision support systems halve fungicide use compared to calendar-based strategies without increasing disease risk. *Communications Earth & Environment*, **2**, 224.
- Lin A., Szeinberg A. (1993) Control of the almond disease *Polystigma* by urea treatments. *Alon Hanotea*, **47**, 15-24.
- Liu Z., Ma H., Jung S., Main D., Guo L. (2020) Developmental mechanisms of fleshy fruit diversity in Rosaceae. *Annual Review of Plant Biology*, **71**, 547-573.

- López-López M., Calderón R., González-Dugo V., Zarco-Tejada P., Fereres E. (2016) Early detection and quantification of almond red leaf blotch using high-resolution hyperspectral and thermal imagery. *Remote Sensing*, **8**, 276.
- López-Moral A., Agustí-Brisach C., Lovera M., Arquero O., Trapero A. (2020) Almond anthracnose: current knowledge and future perspectives. *Plants*, **9**, 945.
- López-Moral A., Agustí-Brisach C., Ruiz-Prados M.D., Lovera M., Luque F., Arquero O., Trapero A. (2023) Biological and urea treatments reduce the primary inoculum of red leaf blotch of almond caused by *Polystigma amygdalinum*. *Plant Disease*, **107**, 2088-2095.
- Madden L.V., Hughes G., van den Bosch F. (2007) *The study of plant disease epidemics*, St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society.
- MAPA (2023a) *Frutos secos: Análisis de la realidad productiva 2021* [Online]. Disponible: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/produccionesagricolas/frutas-y-hortalizas/Analisis%20realidad%20productiva%20frutos%20de%20cascara.aspx> [Consulta: 13/06/2023].
- MAPA (2023b) *Registro de Productos Fitosanitarios*. [Online]. Disponible: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/fitos.asp> [Consulta: 01/05/2023].
- MAPA (2023c) *Superficies y producciones anuales de cultivos* [Online]. Disponible: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/> [Consulta: 07/05/2023].
- Mardones M., Trampe-Jaschik T., Oster S., Elliott M., Urbina H., Schmitt I., Piepenbring M. (2017) Phylogeny of the order Phyllachorales (Ascomycota, Sordariomycetes): among and within order relationships based on five molecular loci. *Persoonia*, **39**, 74-90.
- Miarnau X., Torguet L., Zazurca L., Maldonado M., Girabet R., Batlle I., Rovira M. (2018) El futuro del almendro en España: ¿Será posible producir 4.000 kg de grano/ha? *Horticultura*, **337**, 16-26.
- Miarnau X., Zazurca L., Torguet L., Zúñiga E., Batlle I., Alegre S., Luque J. (2021) Cultivar susceptibility and environmental parameters affecting symptom expression of red leaf blotch of almond in Spain. *Plant Disease*, **105**, 940-947.
- Mirás-Avalos J.M., Gonzalez-Dugo V., García-Tejero I.F., López-Urrea R., Intrigliolo D.S., Egea G. (2023) Quantitative analysis of almond yield response to irrigation regimes in Mediterranean Spain. *Agricultural Water Management*, **279**.
- Montserrat A., Baena O., Bernárdez L., Puig J. (2021) Modelling the impacts of climate change on potential cultivation area and water deficit in five Mediterranean crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **19**, e0301.
- Ollero-Lara A., Agustí-Brisach C., Lovera M., Roca L.F., Arquero O., Trapero A. (2019) Field susceptibility of almond cultivars to the four most common aerial fungal diseases in southern Spain. *Crop Protection*, **121**, 18-27.

- Pérez de los Cobos F., Martínez-García P.J., Romero A., Miarnau X., Eduardo I., Howad W., Mnejja M., Dicenta F., Socias i Company R., Rubio-Cabetas M.J., Gradziel T.M., Wirthensohn M., Duval H., Holland D., Arús P., Vargas F.J., Batlle I. (2021) Pedigree analysis of 220 almond genotypes reveals two world mainstream breeding lines based on only three different cultivars. *Horticulture Research*, **8**, 11.
- Rossi V., Giosuè S., Caffi T. (2010) Modelling plant diseases for decision making in crop protection. *En: Precision Crop Protection - The Challenge and Use of Heterogeneity*, pp. 241-258. Eds Gerhards R., Oerke E., Menz G. & Sikora R. Dordrecht: Springer.
- Rossi V., Sperandio G., Caffi T., Simonetto A., Gilioli G. (2019) Critical success factors for the adoption of decision tools in IPM. *Agronomy*, **9**, 710.
- Saad A.T., Masannat K. (1997) Economic importance and cycle of *Polystigma ochraceum*, causing red leaf blotch disease of almond, in Lebanon. *EPPO Bulletin*, **27**, 481-485.
- Socias i Company R., Gradziel T.M. (2017) *Almonds: Botany, Production and Uses*, Wallingford, UK: CABI.
- Suzuki Y., Tanaka K., Hatakeyama S., Harada Y. (2008) *Polystigma fulvum*, a red leaf blotch pathogen on leaves of *Prunus* spp., has the *Polystigmia pallescens* anamorph/andromorph. *Mycoscience*, **49**, 395-398.
- Tomishima H., Luo K., Mitchell A.E. (2022) The almond (*Prunus dulcis*): chemical properties, utilization, and valorization of coproducts. *Annual Review of Food Science and Technology*, **13**, 145-166.
- Torguet L., Batlle I., Alegre S., Miarnau X. (2016) Nuevas plagas y enfermedades emergentes, una amenaza para el cultivo del almendro en España. *Revista de Fruticultura*, **49**, 152-165.
- Torguet L., Maldonado M., Miarnau X. (2019) Importancia y control de las enfermedades en el cultivo del almendro. *Agricultura*, **1026**, 72-77.
- Trail F. (2007) Fungal cannons: explosive spore discharge in the Ascomycota. *FEMS Microbiology Letters*, **276**, 12-18.
- Tuset J.J., Portilla M.T. (1987) Principales alteraciones del almendro causadas por hongos en el área mediterránea española. *Fruticultura Profesional*, **11**, 13-17.
- Velasco D., Hough J., Aradhya M., Ross-Ibarra J. (2016) Evolutionary genomics of peach and almond domestication. *G3 (Bethesda)*, **6**, 3985-3993.
- Zúñiga E., León M., Berbegal M., Armengol J., Luque J. (2018) A qPCR-based method for detection and quantification of *Polystigma amygdalinum*, the cause of red leaf blotch of almond. *Phytopathologia Mediterranea*, **57**, 257-268.
- Zúñiga E., Luque J., Martos S. (2019) Lignin biosynthesis as a key mechanism to repress *Polystigma amygdalinum*, the causal agent of the red leaf blotch disease in almond. *Journal of Plant Physiology*, **236**, 96-104.

Zúñiga E., Romero J., Ollero-Lara A., Lovera M., Arquero O., Miarnau X., Torguet L., Trapero A., Luque J. (2020) Inoculum and infection dynamics of *Polystigma amygdalinum* in almond orchards in Spain. *Plant Disease*, **104**, 1239-1246.





## **Objectius**

---



## Objectius

La present tesi doctoral té com a objectiu principal la optimització del control de la taca ocre de l'ametller. Per assolir aquest objectiu final, s'estudiaran aspectes clau de l'epidemiologia de *Polystigma amygdalinum*, l'agent causal d'aquesta malaltia, que s'integraran posteriorment en un sistema de suport a la presa de decisions per a l'optimització dels tractaments fungicides.

Els objectius específics d'aquesta tesi doctoral, desenvolupats en capítols successius, proposen:

- ▶ Comparar l'eficàcia de diferents fungicides emprats en el control de la taca ocre de l'ametller en condicions de camp, així com la de diferents estratègies d'aplicació **(Capítol 1)**
- ▶ Estudiar l'epidemiologia de *Polystigma amygdalinum*, amb un interès especial en les relacions entre l'aerobiologia de l'inòcul primari i diverses variables meteorològiques **(Capítol 2)**
- ▶ Desenvolupar un model epidemiològic i validar la seva integració en un sistema de suport a la presa de decisions, per tal d'optimitzar la programació dels tractaments fungicides contra la taca ocre de l'ametller **(Capítol 3)**



**Evaluation of fungicides and application  
strategies for the management of the  
red leaf blotch disease of almond**



Torguet L., Zazurca L., Martínez G., Pons-Solé G., Luque J., Miarnau X.

*Horticulturae* (2022) 8, 501



## Article

# Evaluation of Fungicides and Application Strategies for the Management of the Red Leaf Blotch Disease of Almond

Laura Torguet <sup>1</sup>, Lourdes Zazurca <sup>1</sup>, Guillem Martínez <sup>1</sup>, Gemma Pons-Solé <sup>2</sup> , Jordi Luque <sup>2</sup>  and Xavier Miarnau <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Fruit Production Program, IRTA Fruitcentre, PCiTAL, Park of Gardeny, Fruitcentre Building, E-25003 Lleida, Spain; laura.torguet@irta.cat (L.T.); lourdes.zazurca@irta.cat (L.Z.); guillem.martinez@irta.cat (G.M.)
- <sup>2</sup> Sustainable Plant Protection Program, IRTA Cabriels, Ctra. de Cabriels Km 2, E-08348 Cabriels, Spain; gemma.pons@irta.cat (G.P.-S.); jordi.luque@irta.cat (J.L.)
- \* Correspondence: xavier.miarnau@irta.cat

**Abstract:** Red leaf blotch (RLB) of almond, caused by *Polystigma amygdalinum*, is an important foliar disease of this nut tree in the Mediterranean basin and especially in Spain. In recent years, the control of this disease has become a key factor in the management of Spanish almond orchards. The management of RLB is not easy due to intrinsic factors of the disease (e.g., long infection and latency periods) and the low number of registered fungicides in this country. From 2015 to 2019, different field trials were conducted in the Lleida region, NE Spain, to evaluate the efficacy of several fungicide products and of application strategies to control this disease. Systemic fungicides, which included fluopyram, trifloxystrobin, and mixtures of fluopyram + trifloxystrobin and pyraclostrobin + boscalid, performed better than contact and penetrant products and showed up to 90% control against RLB. However, the efficacy of the tested fungicides varied depending on the year. In terms of application strategies, when fungicide applications were conducted following specific meteorological conditions (after 15 days from >15 mm rainfalls with ≈10–15 °C as the minimum average temperature), their efficacy was comparable to that of calendar-based treatments (every 14, 21, or 31 days from petal fall) but with fewer applications (depending on the year, 2–4 applications as compared with 5–9 for calendar treatments).

**Keywords:** almond; disease management; fungicide; *Polystigma amygdalinum*; *Prunus dulcis*; red leaf blotch disease



**Citation:** Torguet, L.; Zazurca, L.; Martínez, G.; Pons-Solé, G.; Luque, J.; Miarnau, X. Evaluation of Fungicides and Application Strategies for the Management of the Red Leaf Blotch Disease of Almond. *Horticulturae* **2022**, *8*, 501. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060501>

Academic Editors: Dalia Aiello and Vladimiro Guarnaccia

Received: 18 May 2022

Accepted: 2 June 2022

Published: 4 June 2022

Corrected: 14 July 2023

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) acreage and production has increased worldwide over the last few years, mainly due to the development of new cultivars with interesting agronomic characteristics, such as late-blooming and self-fertility, and the change towards new production models in irrigated areas that improve the agronomic and productive characteristics such as the bearing precocity and yield [1–3]. Spain, the country with the largest almond cropping area in the world, leads this acreage increase with over 140,000 ha planted within the last ten years for a total of 687,225 ha [4]. However, in the last decade, crop intensification and plantations in new areas are facing new challenges in the management of almond pests and diseases, such as the occurrence of new diseases and the reemergence of old ones. An example of a reemergent disease is the red leaf blotch (RLB) of almond [5]. The incidence of RLB has increased recently in Spain, mainly due to the expansion of new almond orchards to inland areas, where climatic conditions are more suitable for RLB development [6], and the use of more susceptible cultivars in new plantations [7]. Furthermore, the highly intensive production systems introduced in Spain during recent years, such as high-density plantations, have increased favorable conditions for the development of almond fungal diseases [8,9]. Therefore, disease management is a



key factor in achieving the maximum productive potential to ensure the economic viability of these new almond orchards [10].

RLB is caused by the ascomycete *Polystigma amygdalinum* P.F. Cannon and is one of the most important leaf diseases currently affecting almond trees in the Mediterranean basin and the regions of the Middle East, and particularly in Spain [7,11]. RLB only affects almond leaves, causing diffuse spots of different shapes and sizes, initially yellowish but later turning into reddish brown. In spring, under favorable temperature and humidity conditions, and especially after rain events, ascospores are released from the leaf litter and infect new almond leaves [7,12,13]. In severe RLB infections, early defoliation may occur [11,14], with a consequent decrease in the tree photosynthetic activity and a possible yield reduction, not only in the current season but also in the long term if the infection is persistent [6,15].

According to Almacellas [6], RLB management strategies are generally based on: (i) the use of tolerant cultivars, (ii) crop management practices intended to reduce primary inoculum and therefore the risk of infection, and (iii) the use of fungicides. Cultivar tolerance to RLB should be part of a long-term control strategy, as it has been observed that tolerant cultivars such as 'Mardía' or 'Vairo' can help in reducing RLB infections and thus facilitate the control of the disease [7]. However, 'Guara' and 'Tuono', two highly susceptible cultivars [7], are the most widely planted in Mediterranean countries [3,16], which makes it necessary to consider other management strategies besides cultivar selection. Some cultural practices are focused on eliminating the primary inoculum from the infected leaves that have fallen in the previous year [11], e.g., through the application of crystalline urea on the leaf litter [17]. However, in-season applications of fungicides are still needed to prevent infections and their use is a common control practice in Mediterranean almond orchards.

Regarding the control of RLB with fungicides, the evaluation of plant protection products has been mainly conducted in Middle East countries, mostly in Iran [12,18–22]. According to the results obtained by these studies, mancozeb, copper hydroxide and oxychloride, Bordeaux mixture, and triforine were the most effective fungicides.

One of the major concerns regarding RLB control in Spain is the low number of registered products currently available to use [23]. Moreover, it is difficult to implement an annual fungicide management program without applying the same registered products repeatedly, which can eventually lead to an emerging resistance in pathogen populations [24]. Therefore, it is important to explore new compounds and application strategies that are able to be used in the management of RLB with fungicides.

This study aimed to improve the current control strategies for RLB management in Spain based on the optimization of the usage of fungicides. To achieve this overall goal, some systemic and non-systemic fungicides were tested for their efficacy in a first assay. In a second assay, different application strategies with the best product were evaluated for RLB control.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental Plots

Field trials were conducted in two commercial orchards located in the Lleida region, NE Spain: Alcarràs (UTM coordinates: WGS84 Datum, 31 T x = 283381, y = 4608774) and Vilagrassa (x = 341313, y = 4612125). The orchard in Alcarràs was a standard open-vase of 'Guara' cultivar grafted onto 'INRA GF 677' rootstock, planted in 2000 with a tree spacing distance of 5 m × 5 m. The orchard in Vilagrassa was a standard open-vase of 'Tarraco' cultivar grafted onto 'INRA GF 677', planted in 2007 with a tree spacing distance of 7 m × 6 m. 'Guara' and 'Tarraco' cultivars were chosen for the trials because they are the most susceptible cultivars to RLB that are commonly planted in Spain [7]. All trials were designed as a randomized complete block design with four replicates and four trees per experimental unit.

## 2.2. Fungicide Products Application

All the fungicide compounds used in this study were purchased as commercial products (Table 1). The products in all trials were applied as recommended by the manufacturers (Table 2). The rates for untested or non-registered fungicides on almonds in Spain were evaluated using similar doses to those used on other stone fruits or vegetables (Table 2) [23]. No other fungicides were applied in the orchards during the experimental period.

**Table 1.** Fungicide products evaluated for the control of the almond red leaf blotch between 2015 and 2019 in the Lleida region, Spain.

Active Ingredient	Chemical Group <sup>1</sup>	FRAC Group <sup>2</sup>	Commercial Name	Manufacturer	Formulation <sup>3</sup>	Registered Concentration <sup>4</sup>
Captan	Phthalimide	M4	Capteran 50	Adama Agriculture España SA	500 g kg <sup>-1</sup> WG	2.5–3.0 g L <sup>-1</sup> (peach)
Captan	Phthalimide	M4	Blancado 85	Comercial Química Massó SA	850 g kg <sup>-1</sup> WG	Not registered <sup>5</sup>
Copper oxide	Copper	M1	Nordox 30/30	Comercial Química Massó SA	338 g kg <sup>-1</sup> WG	Not registered <sup>5</sup>
Copper oxide	Copper	M1	Nordox 45	Comercial Química Massó SA	450 g kg <sup>-1</sup> WP	1.5–2 g L <sup>-1</sup> (vegetables)
Cyflufenamid	Amidoxine	U6	Siz	Sipcam Iberia SA	51.3 g L <sup>-1</sup> EW	0.5 mL L <sup>-1</sup> (almond)
Cyproconazole	Triazole	3	Caddy 10 petite	Bayer CropScience SL	100 g kg <sup>-1</sup> WG	0.1–0.2 g L <sup>-1</sup> (peach)
Dodine	Guanidine	M7	Syllit Flow	Arysta Lifescience Iberia SL	544 g L <sup>-1</sup> SC	1.1–1.3 mL L <sup>-1</sup> (almond)
Fenbuconazole	Triazole	3	Impala Star	Dow Agrosciences Iberica SA	25 g L <sup>-1</sup> EW	3.0–8.4 mL L <sup>-1</sup> (almond)
Fenbuconazole	Triazole	3	Impala	Dow Agrosciences Iberica SA	50 g L <sup>-1</sup> EW	1.5–2.0 mL L <sup>-1</sup> (almond)
Fenpyrazamine	Pyrazolium	7	Prolectus	Kenogard SA	500 g kg <sup>-1</sup> WG	0.8–1.2 g L <sup>-1</sup> (peach)
Fluopyram	Carboxamide	7	Luna Privilege	Bayer CropScience SL	500 g L <sup>-1</sup> SC	0.3–0.5 mL L <sup>-1</sup> (peach)
Folpet	Phthalimide	M4	Folpan 80	Adama Agriculture España SA	800 g L <sup>-1</sup> WG	2.0 g L <sup>-1</sup> (vegetables)
Myclobutanil	Triazole	3	Systhane 25	Dow Agrosciences Iberica SA	25 g L <sup>-1</sup> EW	2.0–6.0 mL L <sup>-1</sup> (vegetables)
Penthiopyrad	Carboxamide	7	Fontelis	Dupont Iberica	200 g L <sup>-1</sup> SC	1.5 mL L <sup>-1</sup> (vegetables)
Tebuconazole	Triazole	3	Orius	Nufarm España SA	200 g L <sup>-1</sup> EW	0.9–0.1 mL L <sup>-1</sup> (apricot)
Thiram	Carbamate	M3	Tiram Flow	Exclusivas Sarabia SA	500 g L <sup>-1</sup> SC	Not registered <sup>5</sup>
Trifloxystrobin	Strobilurin	11	Flint	Bayer CropScience SL	500 g L <sup>-1</sup> WG	0.2 g L <sup>-1</sup> (peach)
Fluopyram + trifloxystrobin	Carboxamide, strobilurin	7 11	Luna Sensation	Bayer CropScience SL	250 g L <sup>-1</sup> and 250 g L <sup>-1</sup> SC	0.6–0.8 mL L <sup>-1</sup> (vegetables)
Isopyrazam + difenoconazole	Pyrazole, triazole	7 3	Embrelia	Adama Agriculture España SA	100 g L <sup>-1</sup> and 40 g L <sup>-1</sup> SC	1 mL L <sup>-1</sup> (peach)
Pyraclostrobin + boscalid	Strobilurin, carboxamide	11 7	Signum	Basf Española SL	67 g kg <sup>-1</sup> and 267 g kg <sup>-1</sup> WG	1.0 g L <sup>-1</sup> (almond)
Tebuconazole + trifloxystrobin	Triazole, strobilurin	3 11	Flint Max	Bayer CropScience SL	500 g L <sup>-1</sup> and 250 g L <sup>-1</sup> WG	0.3 mL L <sup>-1</sup> (peach)

<sup>1</sup> Lewis et al. [25]. <sup>2</sup> Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). List of fungicides' common names [26]. <sup>3</sup> WP, wettable powder; WG, water dispersible granule; EW, water emulsion; SC, suspension concentrate. <sup>4</sup> Registered concentrations in Spain [23]. <sup>5</sup> Not registered use in Spain [23].

**Table 2.** Trials of fungicides against the almond red leaf blotch conducted in 2015–2017 in the Lleida region, Spain, using alternating products.

Trial	Year	Location	Cultivar	Fungicide <sup>1</sup>	Rate (%)	Alternate Product <sup>2</sup>	Starting Time <sup>3</sup>	Timing between Sprays	Number of Sprays
1	2015	Alcarràs	'Guara'	Captan 50%	0.250	Thiram 50% at 0.250	Petal fall	Every 14 days	4
				Cyproconazole 10%	0.015				
				Dodine 54,4%	0.100				
				Captan 50d%	0.250				
				+ dodine 54.4%	0.100				
2	2016	Alcarràs	'Guara'	Cyproconazole 10%	0.015	Captan 50% at 0.250	Petal fall	Every 14 days	4
				Fenbuconazole 5%	0.150				
				Fluopyram 20%	0.040				
				Fluopyram 20% + trifloxystrobin 20%	0.040				
				Penthiopyrad 20%	0.150				
				Pyraclostrobin 6.7% + boscalid 26.7%	0.100				
				Tebuconazole 20%	0.100				
				Thiram 50%	0.250				
				Trifloxystrobin 50%	0.015				
				3	2017				
Fenpyrazamine 50%	0.120								
Fluopyram 25% + trifloxystrobin 25%	0.040								
Isopyrazam 10% + difenconazole 4%	0.150								
Penthiopyrad 20%	0.150								
Pyraclostrobin 6.7% + boscalid 26.7%	0.100								
Tebuconazole 20%	0.100								
Thiram 50%	0.250								
Trifloxystrobin 50%	0.015								

<sup>1</sup> Untreated control (UTC) included in all trials. <sup>2</sup> Product used between each spray of tested fungicides. <sup>3</sup> Phenological stage [27].

Products were applied to runoff using a manual sprayer (Gaysa, Librilla, Spain) with a single nozzle. The volume of the fungicide solution was calibrated to approximately 1000 L/ha, which is a common commercial rate used in Spanish almond-growing regions. An untreated control (UTC) was included in each trial using tap water instead of fungicide solutions.

### 2.3. Experimental Trials

#### 2.3.1. Fungicide Selection Trials

In the first stage, different fungicide products were evaluated in the period of 2015–2019 in different trials (Tables 2 and 3). All the fungicide applications were made in the spring-summer period (March–July), starting at petal fall [27], which usually occurs during the second half of March. The spray timings were set on a calendar basis (every 14 or 21 days), and the number of applications was established (4 to 5) before trials onset.

The fungicides were tested by being alternated with other fungicides in 2015, 2016, and 2017 (Table 2), and by being tested as single products in 2015, 2018, and 2019 (Table 3).

**Table 3.** Trials of fungicides against the almond red leaf blotch conducted in 2015–2019 in the Lleida region, Spain, using single products.

Trial	Year	Location	Cultivar	Fungicide <sup>1</sup>	Rate (%)	Starting Time <sup>2</sup>	Timing Between Sprays	Number Of Sprays
1	2015	Alcarràs	'Guara'	Captan 85%	0.150	Petal fall	Every 14 days	5
				Copper oxide 30%	0.075			
				Copper oxide 45%	0.050			
				Copper oxide 30%	0.075			
				+ captan 85%	0.150			

Table 3. Cont.

Trial	Year	Location	Cultivar	Fungicide <sup>1</sup>	Rate (%)	Starting Time <sup>2</sup>	Timing Between Sprays	Number Of Sprays
2	2018	Alcarràs	'Guara'	Cyflufenamid 5.13%	0.500	Petal fall	Every 21 days	4
				Dodine 40%	0.200			
				Fenbuconazole 2.5%	0.300			
				Fenpyrazamine 50%	0.120			
				Folpet 80%	0.200			
				Fluopyram 20% + trifloxystrobin 20%	0.040			
				Penthiopyrad 20%	0.150			
				Pyraclostrobin 6.7% + boscalid 26.7%	0.100			
				Trifloxystrobin 25% + tebuconazole 50%	0.030			
3	2019	Vilagrassa	'Tarraco'	Dodine 54.4%	0.125	Petal fall	Every 21 days	4
				Fenbuconazole 2.5%	0.300			
				Myclobutanil 2.5%	0.060			
				Penthiopyrad 20%	0.150			
				Pyraclostrobin 6.7% + boscalid 26.7%	0.100			

<sup>1</sup> Untreated control (UTC) included in all trials. <sup>2</sup> Phenological stage [27].

### 2.3.2. Application Strategies Trials

Different application strategies were evaluated in 2017–2018 (Table 4) using pyraclostrobin + boscalid, one of the registered products for almonds in Spain that performed better in the above screening trials. All strategies started at petal fall. In all cases, the spray programs did not include any alternating fungicide, and the final seasonal number of fungicide applications was dependent on the tested strategy. UTC sprays with tap water were performed at each cadence interval. We compared the calendar-based applications (every 14, 21, or 31 days) with the spray programs based on the meteorological data. For the latter, sprays were conducted after >15 mm rainfall, or 15 days after >15 mm rainfall with  $\approx 10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$  as the mean minimum temperature. These action thresholds were set according to the results obtained by Miarnau et al. [7] and Zúñiga et al. [28], who showed that temperature and rainfall data from specific periods were related to the seasonal RLB incidence and the primary inoculum dynamics, respectively.

**Table 4.** Trials of fungicide application strategies against the almond red leaf blotch conducted in 2017–2018 in Alcarràs, Lleida region, Spain.

Trial	Year	Fungicide	Rate (%)	Strategy <sup>1</sup>	Starting Time <sup>2</sup>	Application Timing	Number of Sprays
1	2017	Pyraclostrobin 6.7% + boscalid 26.7%	0.100	Cadence 1	Petal fall	Every 14 days	9
				Cadence 2	Petal fall	Every 21 days	6
				Meteorological 1	Petal fall	After >15 mm rainfalls 15 days after >15 mm rainfall with $\approx 10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$ as mean minimum temp.	5
				Meteorological 2	Petal fall	15 days after >15 mm rainfall with $\approx 10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$ as mean minimum temp.	3
2	2018	Pyraclostrobin 6.7% + boscalid 26.7%	0.100	Cadence 1	Petal fall	Every 21 days	7
				Cadence 2	Petal fall	Every 31 days 15 days after >15 mm rainfall with $\approx 10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$ as mean minimum temp. (applications until June)	5
				Meteorological 1	Petal fall	15 days after >15 mm rainfall with $\approx 10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$ as mean minimum temp.	2
				Meteorological 2	Petal fall	15 days after >15 mm rainfall with $\approx 10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$ as mean minimum temp.	4

<sup>1</sup> Untreated control (UTC) included in all trials. <sup>2</sup> Phenological stage [27].

#### 2.4. Disease Assessment

In each trial, a sample of 100 leaves per replicate block (50 leaves per each two central trees in each experimental unit) of each treatment was evaluated once in the summer (July or August, depending on the year). Fully expanded leaves were randomly collected from new shoots at different heights and orientations located in the outer canopy of each tree. The disease incidence and severity were evaluated according to the procedures described by Miarnau et al. [7]. The RLB incidence was recorded as the percentage of leaves showing at least one identifiable RLB lesion regardless of its size, whereas RLB severity was estimated from the mean proportion of the affected leaf surface. The efficacy of the products was calculated from the severity data using a modification of Abbott's formula [29]:  $\text{Efficacy} = 100 \times (1 - (S_T/S_{UTC}))$ , where  $S_T$  stands for the mean severity index in a given treatment and  $S_{UTC}$  stands for the mean severity index in UTC.

#### 2.5. Data Analysis

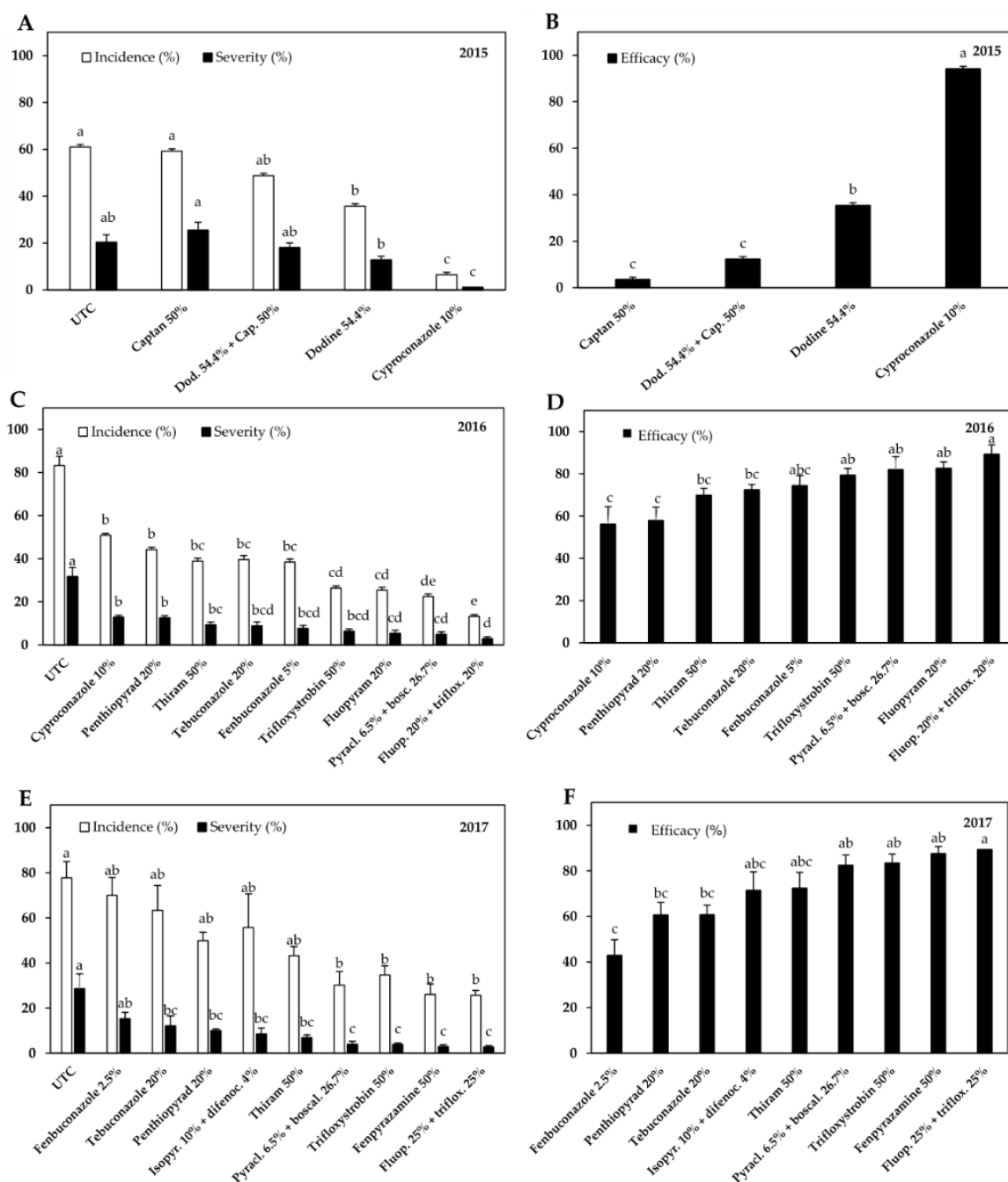
Experimental data were analyzed using JMP (Version 16.0.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Each trial was analyzed separately. Linear mixed models, including fungicide treatment or application strategy as fixed factors and block as a random factor, were fitted to the dependent variables of disease incidence, severity, and fungicide efficacy. The percentage data were arcsine-transformed prior to analysis. The mean comparisons among treatments were evaluated by Tukey–Kramer's test at  $\alpha = 0.05$ .

### 3. Results

RLB incidence and severity in the UTC were the highest among treatments in nearly all trials, with values roughly in the range from 60 to 90% and from 20 to 40%, respectively. In trials conducted in 2018 in Alcarràs, the UTC showed the lowest values of RLB incidence (35% and 45% for the fungicide selection and application strategy trials, respectively) and severity (12% in both trials) from among all experiments and years.

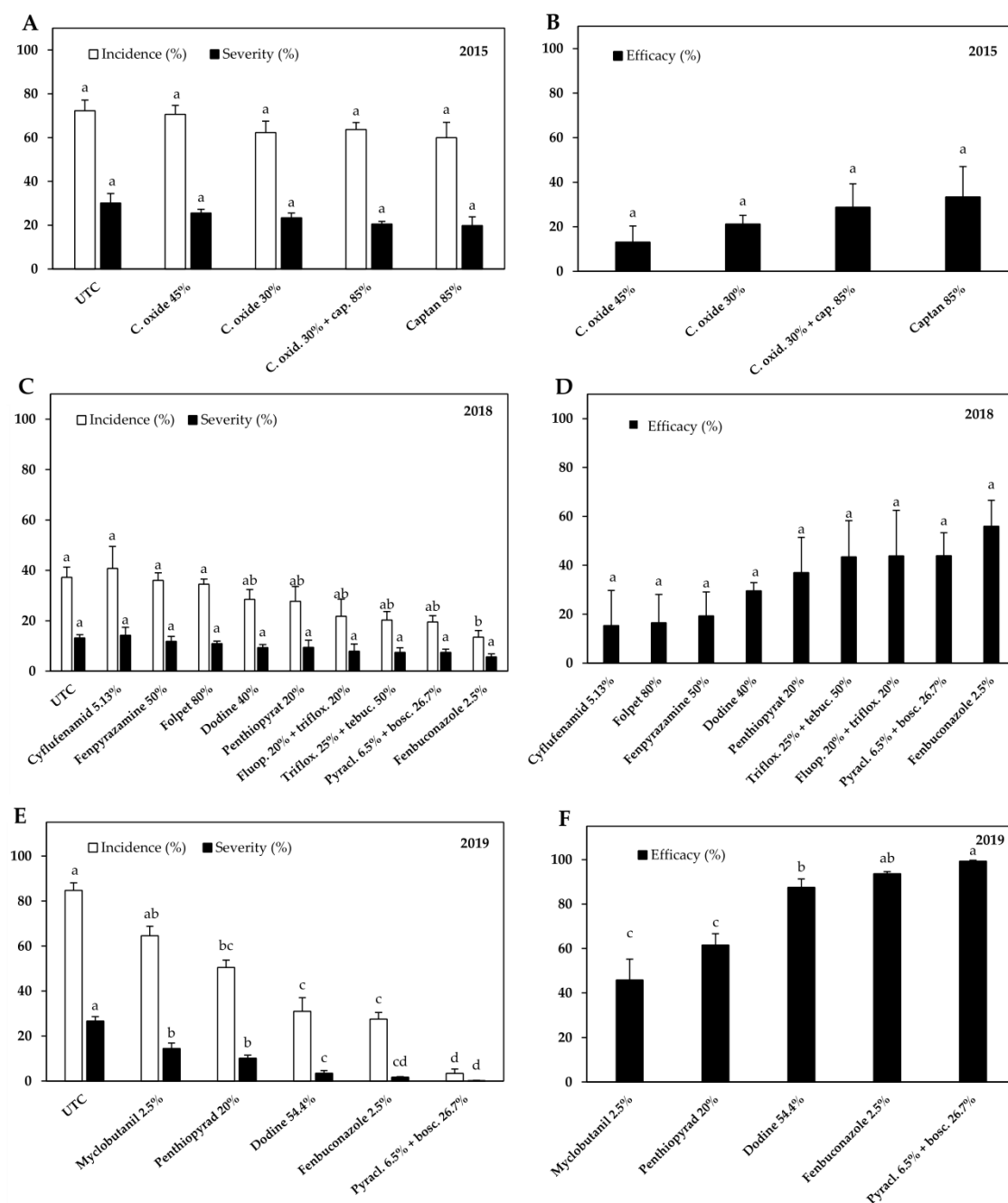
#### 3.1. Fungicide Selection

Several fungicides were evaluated in 2015–2017 in alternating sprays with contact compounds such as thiram (in 2015), captan (2016), and folpet (2017) (Table 2, Figure 1). The trial conducted in 2015 with cyproconazole, dodine, captan, and a mixture of dodine and captan confirmed that cyproconazole and dodine significantly reduced RLB incidence ( $p < 0.001$ ), whereas only cyproconazole additionally reduced severity ( $p < 0.001$ ) (Figure 1A). In terms of efficacy, cyproconazole performed the best in this trial (over 90%), and the rest of the products showed less than 40% efficacy (Figure 1B). Captan and the mixture made of dodine and captan showed the lowest efficacies (3.6 and 12.4%, respectively), with no significant differences found between them. Cyproconazole and dodine showed efficacy values that were significantly higher ( $p < 0.001$ ) than the rest of the products. In 2016, significant reductions in RLB incidence and severity between all the products and the corresponding UTC were detected (all  $p < 0.001$ ) (Figure 1C). All the fungicides showed efficacy indices greater than 50% (Figure 1D). The five best products this season, in the order of efficacy, were fenbuconazole, trifloxystrobin, pyraclostrobin + boscalid, fluopyram, and fluopyram + trifloxystrobin; all of them showed efficacies greater than 75%. In 2017, four products significantly reduced disease incidence and severity with respect to the UTC ( $p < 0.001$ ), namely fluopyram + trifloxystrobin, fenpyrazamine, pyraclostrobin + boscalid, and trifloxystrobin (Figure 1E). Four additional fungicides (tebuconazole, penthiopyrad, isopyrazam + difenoconazole, and thiram) showed significant differences in their mean severity values with respect to the UTC ( $p < 0.001$ ). These values resulted in overall efficacies in the range between 60 and 90%, except for fenbuconazole, with an overall efficacy of only 43% (Figure 1F).



**Figure 1.** Disease incidence and severity (A,C,E) and control efficacy (B,D,F) of red leaf blotch in almond trees managed with different contact and systemic fungicides in combination with alternate products (2015–2017). The efficacy was calculated using Abbott’s formula [29]. Treatment means with different letters are significantly different according to Tukey–Kramer’s test ( $p < 0.05$ ). The error bars indicate the standard error of the mean.

Regarding the fungicide trials without alternate products, a trial conducted in 2015 involving different copper-based products and an additional mixture of copper/captan indicated that copper products showed an overall disease reduction of less than 25% (Figure 2A,B).



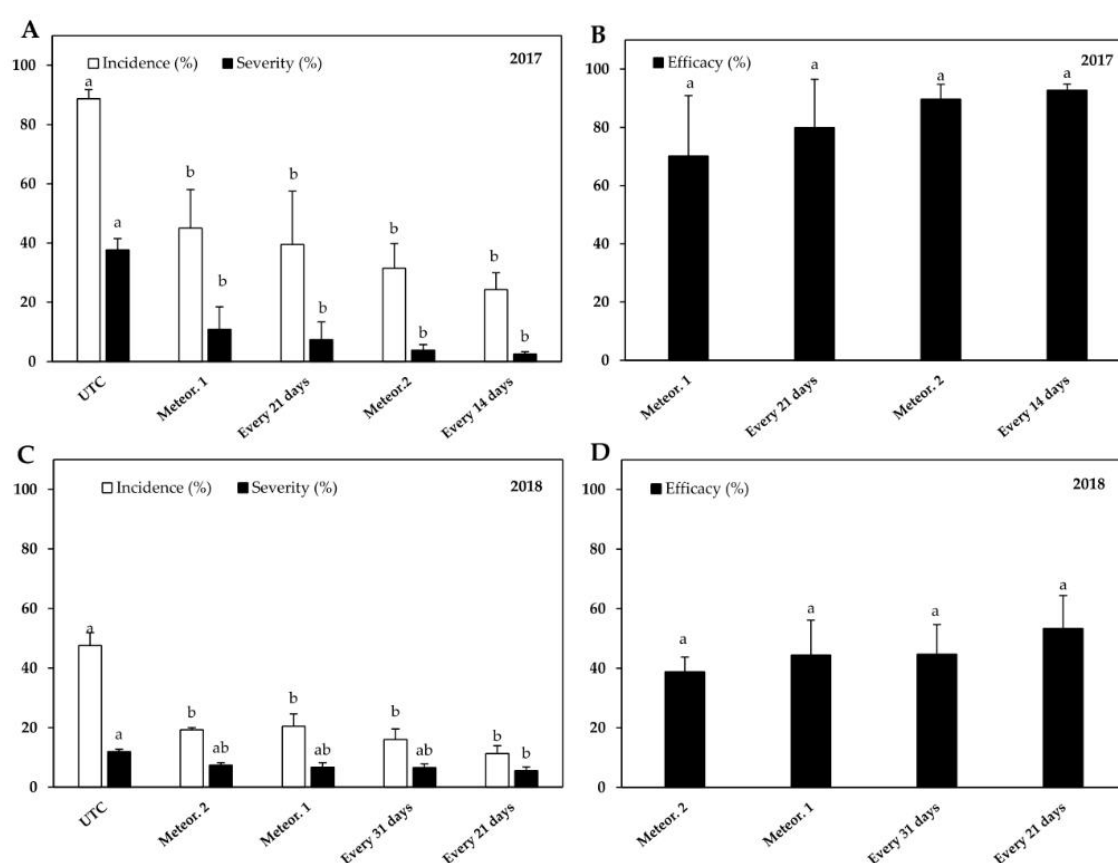
**Figure 2.** Disease incidence and severity (A,C,E) and control efficacy (B,C,F) of red leaf blotch in almond trees managed with different contact and systemic fungicides in non-alternating sprays (2015, 2018, and 2019). The efficacy was calculated using Abbott's formula [29]. Treatment means with different letters are significantly different according to Tukey–Kramer's test ( $p < 0.05$ ). The error bars indicate the standard error of the mean.

The highest efficacies were obtained with captan and the copper/captan mixture (33.4% and 28.8%, respectively). However, no significant differences were detected between treatments and the UTC in terms of RLB incidence, severity, and treatment efficacy (Figure 2A,B). In 2018 and 2019, trials mostly included systemic fungicides. In 2018, the

incidence and severity of RLB were low in the UTC (less than 40% and 20%, respectively) and in the fungicide treatments (Figure 2C). Among the tested products, only fenbuconazole showed a significant reduction in incidence compared to the UTC ( $p < 0.001$ ), which corresponded to a 56% efficacy. Pyraclostrobin + boscalid, fluopyram + trifloxystrobin, and trifloxystrobin + tebuconazole showed similar, higher efficacies (43–44%). However, no significant differences in terms of efficacy were detected among fungicides in 2018 (Figure 2D). In 2019, a trial was conducted to evaluate some of the best products tested in previous years, which included the most efficient, newly registered products in Spain for the management of almond diseases. All tested products significantly reduced both RLB incidence and severity ( $p < 0.001$ ), except for myclobutanil, which only reduced RLB severity (Figure 2E). Pyraclostrobin + boscalid, fenbuconazole, and dodine, listed in a decreasing order of efficacy, showed efficacy indices greater than 85% (Figure 2F).

### 3.2. Application Strategies

All the evaluated strategies showed a moderate to high control of the disease, with higher efficacies in 2017 (over 70% on average) than in 2018 (40–50%). In 2017, significant reductions in RLB incidence and severity were found between all treatments and the UTC ( $p < 0.001$ ) (Figure 3A).



**Figure 3.** Disease incidence and severity (A,C) and control efficacy (B,D) of red leaf blotch in almond trees managed with different strategies of fungicide sprays (2017 and 2018). The efficacy was calculated using Abbott’s formula [29]. Treatment means with different letters are significantly different according to Tukey–Kramer’s test ( $p < 0.05$ ). The error bars indicate the standard error of the mean.



In 2018, significant differences in RLB incidence were also found between all treatments and the UTC, but only for one of the treatments in the case of RLB severity (Figure 3C). In addition, no significant differences were found among treatment efficacies, although treatments with a fixed application cadence generally showed higher efficacies (80–93% in 2017 and 45–54% in 2018), as compared to the application strategies following epidemiological criteria (70–90% in 2017, and 39–44% in 2018) (Figure 3B,D). However, a smaller number of spray applications was used in the weather-based strategies (2 to 5 applications) as compared to the calendar-based ones (5 to 9) (Table 4).

#### 4. Discussion

An effective management of almond RLB using fungicides demands that the most effective fungicides be used in improved application strategies, especially in those areas which are planted with highly susceptible cultivars to RLB. In Middle Eastern countries, previous research reported a good efficacy for the performance of triforine and a medium efficacy for some copper-based products, with one application at petal fall and two additional applications at 14-day intervals [12,18,19]. In Spain, captan, thiram, and mancozeb have been recommended for decades for use from petal fall to mid-summer [6,10,30], but all of these are no longer accepted [31]. In recent years, new systemic fungicide products have been marketed in Spain to control different fungal diseases in almonds other than RLB [23]. Therefore, we were interested in evaluating the suitability of these new products for the control of the RLB disease. In addition, we were especially interested in developing an optimized strategy for the timing of the application of these products.

*P. amygdalinum* is a hemibiotrophic pathogen [28] that cannot be isolated and grown on synthetic culture media [12]. Consequently, the evaluation of the efficacy of fungicides is better performed under natural field conditions that are suitable for pathogen development. This is a serious constraint for a number of fungicides and strategies to be tested under such conditions. However, our trials were conducted in an area where RLB occurs naturally [7,28,30]. In the current study, the UTC incidence levels during the experimental period (60–90%) were comparable to those reported by Miarnau et al. [7]. The results obtained in the fungicide selection trials confirmed the differential behavior of fungicides in terms of RLB control efficacy.

In the first stage, we were interested in the evaluation of contact (captan, copper-based fungicides, folpet, and thiram) and penetrant (dodine) products. Overall, these products presented a high variability in efficacy (4–88%), with 4–5 spray applications performed after petal fall every 14 or 21 days. Among these contact products, dithiocarbamates (thiram, with 70–72% efficacy in 2016 and 2017) performed better than phthalimides (captan and folpet, with 4–33% and 17% efficacy, respectively, depending on the year). Differences in the efficacy values for captan could likely be due to the different percentage of the active ingredient used in the formulated captan products (50% or 85%), as higher RLB control was observed in the latter case. Similarly, dodine performed better when applied alone (88% efficacy) at a higher concentration (54.4%) than when applied at a lower (40%) concentration (29.6% efficacy). Moreover, the efficacy of dodine at a higher concentration significantly decreased when it was applied alternately with thiram (35.5% efficacy) or mixed with captan (12.4% efficacy). It is suggested that the better efficacy performance of dodine, as compared to phthalimides, could be due to its different mode of action (i.e., as a membrane disruptor) and its additional penetrant action [25].

Copper-based products, commonly used as fungicides in autumn and winter applications [32], showed low levels of RLB control in seasonal applications (less than 30% efficacy). Similarly, results with low to moderate levels of RLB control were obtained by Banihashemi [12], Tork et al. [19], and Amanifar [18], thus confirming that copper-based compounds would not be the best products to choose for the management of RLB.

The systemic products evaluated in this study were tested in alternate combinations with captan (in 2016) and folpet (2017) or alone (2018 and 2019). The overall efficacy of systemic fungicides was higher than that observed with contact and penetrant products.

The systemic products used in this study are either included in FRAC groups 3 (sterol biosynthesis inhibitors), 7 (succinate dehydrogenase inhibitors), 9 (methionine biosynthesis inhibitors), or 11 (respiration inhibitors) [26]. The fungicides in FRAC group 7 (fluopyram, penthiopyrad, and boscalid) and FRAC group 11 (trifloxystrobin and piraclostrobin) were the most effective, with efficacies between 60 and 90% depending on the year and the type of trial. Furthermore, the efficacy was higher when the commercial product was a mixture of two active ingredients belonging to FRAC groups 7 and 11. To the best of our knowledge, this is the first time that these products have been tested in field conditions for the control of RLB. Fluopyram was reported to control the fungal diseases of vegetable and fruit crops caused by powdery mildews, *Botrytis*, *Monilinia*, and *Sclerotinia* [33]. The combination of Fluopyram + trifloxystrobin is registered in the USA for the control of the blossom blight, shot hole, rust, and hull rot of almonds [34]. Strobilurin products (pyraclostrobin and trifloxystrobin) have been also reported to be highly effective against different fungal diseases [35], and specifically against rust, brown rot, and the shot hole diseases of the almond [36].

Contact and penetrant products (captan, folpet, and dodine) may be good candidates for use in an alternated combination with systemic fungicides, as they could help in avoiding the emergence of resistant pathogen strains. The alternate use of captan and folpet in 2016 and 2017, respectively, in combination with several systemic fungicides, resulted in overall higher efficacies. Some of the efficacies obtained in 2016 and 2017 with the same fungicide (e.g., fluopyram + trifloxystrobin and pyraclostrobin + boscalid) but using two different alternate products, were similar. On the other hand, some systemic fungicides (e.g., fenbuconazole) performed differentially in combination with an alternate product, but further research is still needed to clarify the alternate use of fungicides in terms of RLB control efficacy. Finally, contact products may need multiple applications, as they can be washed off by rain, and new, growing shoots may need continued periodic protection.

In general, the efficacies of fungicides were lower in years with low levels of disease (e.g., in 2018) in both the fungicide screening and the application strategy trials, as compared to the rest of the experiments. This issue could be related to less precise measurements of both disease incidence and severity at low disease levels, which resulted in a higher variability and non-significant mean treatment comparisons and hence, in a disputed disease control efficacy [37].

As a general overview, we classified the fungicide products used in this study into three main categories depending on their overall efficacy during the trials. In the first category, higher efficacies (75–95%) were shown by fluopyram, trifloxystrobin and its mixture, pyraclostrobin + boscalid, trifloxystrobin + tebuconazole, and fenbuconazole. A second group with moderate efficacies (50–75%) included penthiopyrad, fenpyrazamine, thiram, isopyrazam + difenoconazole, tebuconazole, cyproconazole, and dodine. Finally, the third group showed the lowest efficacies (<50%) and included folpet, cyflufenamid, myclobutanil, captan, and copper products.

Regarding the evaluation of the different application strategies, all the treatments reduced the disease levels compared to the UTC, but no significant differences were found between strategies in terms of the disease incidence reduction. Treatments with a fixed application cadence showed higher efficacies as compared to the application strategies following the meteorological criteria, although the differences were not statistically significant. These results agree with different authors [12,18–22,38] who recommended one fungicide application at petal fall and two additional ones at 14 days as the most effective program in reducing the rate of disease. However, great differences in the number of total seasonal applications were observed among the strategies, which is relevant in view of the economic and environmental implications. In line with this observation, the most sustainable strategies followed the meteorological criteria, especially the strategy of combining hydrothermal variables (15 days after >15 mm rainfall, with  $\approx 10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$  as minimum temperature). This strategy only accounted for 2–4 annual applications, which dramatically contrasted with the number of fungicide sprays conducted in the calendar-based strategies (5 to 9). These

meteorological strategies could prevent leaf infections, as hydrothermal parameters are likely related to ascospore outbreaks from ascocarps [12], and the progress of symptom expression [7].

This work is a first step in the developing of a sustainable fungicide program based on a prediction model for the management of RLB disease with fungicides. Further research is therefore needed to validate the best product combinations and their application at specific moments where disease infections may occur.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.T. and X.M.; methodology, L.T., L.Z., G.M., G.P.-S., J.L., and X.M.; software, X.M.; validation, L.T., J.L., and X.M.; formal analysis, L.T., J.L., and X.M.; investigation, L.T., L.Z., G.M., G.P.-S., J.L., and X.M.; resources, L.T. and X.M.; data curation, L.T., J.L., and X.M.; writing—original draft preparation, L.T. and X.M.; writing—review and editing, L.T., G.P.-S., J.L., and X.M.; visualization, L.T., J.L., and X.M.; supervision, J.L. and X.M.; project administration, L.T., J.L., and X.M.; funding acquisition, L.T., G.P.-S., J.L., and X.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Research funded by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Spain, with grants RTA2013-00004-C03-01 and RTA2017-00009-C04-01, and the Agencia Estatal de Investigación (AEI), Spain with grant PID2020-114648RR-C31 (MCIN/AEI/10.13039/50110 0011033). All researchers, except GP, were supported by the CERCA Program, Generalitat de Catalunya. GP was supported by the Agencia Estatal de Investigación (AEI), Spain, through a predoctoral grant (PRE2018-085207).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author (XM) upon reasonable request.

**Acknowledgments:** This research is part of the doctoral dissertation of the author G.P.-S., enrolled in the Ph.D. program in Plant Biology and Biotechnology at the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Battle, I.; Dicenta, F.; Socias i Company, R.; Gradziel, T.M.; Wirthensohn, M.; Duval, H.; Vargas, F.J. Classical genetics and breeding. In *Almonds, Botany, Production and Uses*; Socias i Company, R., Gradziel, T.M., Eds.; CAB International: Boston, MA, USA, 2017; pp. 111–148.
- Gradziel, T.; Curtis, R.; Rafel Socias i Company. Production and growing regions. In *Almonds, Botany, Production and Uses*; Rafel Socias i Company, Gradziel, T.M., Eds.; CAB International: Boston, MA, USA, 2017; pp. 70–86.
- Socias I Company, R.; Gómez Aparisi, J.; Alonso, J.M.; Rubio-Cabetas, M.J.; Kodad, O. Retos y perspectivas de los nuevos cultivares y patrones de almendro para un cultivo sostenible. *Inf. Técnica Económica Agrar.* **2009**, *105*, 99–116.
- MAPA a. Avances de. Superficies y Producciones Anuales de Cultivos, año. 2020. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos> (accessed on 8 November 2021).
- Torguet, L.; Battle, I.; Alegre, S.; Miarnau, X. Nuevas plagas y enfermedades emergentes, una amenaza para el cultivo del almendro en España. *Rev. De Frutic.* **2016**, *49*, 152–165.
- Almacellas, J. Síntomas, daños y métodos de control de la mancha ocre del almendro. *Vida Rural.* **2014**, *389*, 28–32.
- Miarnau, X.; Zazurca, L.; Torguet, L.; Zúñiga, E.; Battle, I.; Alegre, S.; Luque, J. Cultivar susceptibility and environmental parameters affecting symptom expression of red leaf blotch of almond in Spain. *Plant Dis.* **2021**, *105*, 940–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Miarnau, X.; Montserrat, R.; Battle, I.; Alegre, S.; Vargas, F.J. High density planting in almond orchards. In Proceedings of the VI International Symposium on Almonds and Pistachios (ISHS), Murcia, Spain, 27–31 May 2013.
- Miarnau, X.; Torguet, L.; Battle, I.; Alegre, S. El cultivo del almendro en alta densidad. *Rev. De Frutic.* **2016**, *49*, 68–87.
- Torguet, L.; Maldonado, M.; Miarnau, X. Importancia y control de las enfermedades en el cultivo del almendro. *Agricultura* **2019**, *1026*, 72–77.
- Cannon, P. Systematics and diversity of the Phyllachoraceae associated with Rosaceae, with a monograph of *Polystigma*. *Mycol. Res.* **1996**, *100*, 1409–1427. [[CrossRef](#)]

12. Banihashemi, Z. Biology and control of *Polystigma ochraceum*, the cause of almond red leaf blotch. *Plant Pathol.* **1990**, *39*, 309–315. [CrossRef]
13. Saad, A.T.; Masannat, K. Economic importance and cycle of *Polystigma ochraceum*, causing red leaf blotch disease of almond, in Lebanon. *EPPO Bull.* **1997**, *27*, 481–485. [CrossRef]
14. Kranz, J. Plant diseases in Cyrenaica. *FAO Plant Prot. Bull.* **1962**, *10*, 121–125.
15. López-López, M.; Calderón, R.; González-Dugo, V.; Zarco-Tejada, P.J.; Fereres, E. Early detection and quantification of almond red leaf blotch using high-resolution hyperspectral and thermal imagery. *Remote Sens.* **2016**, *8*, 276. [CrossRef]
16. Dicenta, F.; Sánchez-Pérez, R.; Rubio, M.; Egea, J.; Batlle, I.; Miarnau, X.; Palasciano, M.; Lipari, E.; Confolent, C.; Martínez, P.; et al. The origin of the self-compatible almond ‘Guara’. *Sci. Hortic.* **2015**, *197*, 1–4. [CrossRef]
17. Lin, A.; Szeinberg, A. Control of the almond disease *Polystigma* by urea treatments. *Hassadeh* **1992**, *73*, 62–66.
18. Amanifar, N. Evaluation of the efficiency of two fungicides on the control of almond leaf blotch disease on two cultivars in along Zayanderood. *J Plant Prot.* **2017**, *31*, 166–171.
19. Bayt Tork, D.; Taherian, M.; Divan, R. Evaluation of some fungicides for controlling almond red leaf blotch (*Polystigma amygdalinum*). *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* **2014**, *4*, 1011–1016.
20. Sahragard, N.; Eshaghi, R.; Aflaki, M.R.; Banihashemi, Z. Time of fungicide application against *Polystigma amygdalinum* in almond based on ascospore discharge in Chahar Mahal va Bakhtiari province. *Iran. J. Plant Pathol.* **2007**, *43*, 219–239.
21. Shabi, E.; Elisha, S.; Kessel, G.J.; Birger, R.; Singer, G. Almond anthracnose and red leaf blotch (RLB) and their control and the influence of fungicide treatment on rust build up. *Fungic. Nematic. Tests* **1988**, *43*, 82.
22. Sharifi-Tehrani, A. Etude comparée de Faction de quelques fongicides sur les taches brunes de l’amandier *Polystigma ochraceum* (Wahl.) Sacc. *Meded. Van De Facutiteit Landbouwwet. Rijksuniv. Gent* **1985**, *50*, 1259–1263.
23. MAPA, b. Registro de Productos Fitosanitarios. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/fitos.asp> (accessed on 8 November 2021).
24. Lucas, J.A.; Hawkins, N.J.; Fraaije, B.A. The evolution of fungicide resistance. *Adv. Appl. Microbiol.* **2015**, *90*, 29–92. [CrossRef]
25. Lewis, K.A.; Tzilivakis, J.; Warner, D.; Green, A. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* **2016**, *22*, 1050–1064. [CrossRef]
26. Fungicide Resistance Action Committee. FRAC Code List ©\*2020: Fungal Control Agents Sorted by Cross Resistance Pattern and Mode of Action. Available online: <https://www.frac.info/knowledge-database/knowledge-database> (accessed on 17 February 2021).
27. Felipe, A.J. Estados fenológicos del almendro. Información Técnica Económica. *Agraria* **1977**, *8*, 8–9.
28. Zúñiga, E.; Romero, J.; Ollero-Lara, A.; Lovera, M.; Arquero, O.; Miarnau, X.; Torguet, L.; Trapero, A.; Luque, J. Inoculum and infection dynamics of *Polystigma amygdalinum* in almond orchards in Spain. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 1239–1246. [CrossRef] [PubMed]
29. Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **1925**, *18*, 265–267. [CrossRef]
30. Zúñiga, E.; Luque, J.; Torguet, L.; Miarnau, X. Biología y epidemiología de la mancha ocre del almendro en Cataluña. *Rev. De Frutic.* **2017**, *57*, 6–15.
31. MAPA c. Lista de Sustancias Activas Aprobadas, Excluidas y en Evaluación Comunitaria, Sustancias de Bajo Riesgo, Sustancias Candidatas a la Sustitución y Lista de Sustancias Básicas. Available online: [https://www.mapa.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/Lista\\_Sustancias\\_activas\\_aceptadas\\_excluidas.pdf](https://www.mapa.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/Lista_Sustancias_activas_aceptadas_excluidas.pdf) (accessed on 23 November 2021).
32. Torguet, L.; Martínez, G.; Girabet, R.; Zazurca, L.; Maldonado, M.; Miarnau, X. La mancha bacteriana, una enfermedad de gran expansión en el cultivo del almendro en España. *Vida Rural.* **2020**, *480*, 10–15.
33. Veloukas, T.; Karaoglanidis, G.S. Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. *Pest Manag. Sci.* **2011**, *68*, 858–864. [CrossRef]
34. Stack, A.J.; Madra, M.; Gordon, T.R.; Bostock, R.M. Seasonal variation in host susceptibility to *Fusarium canker* in young almond trees. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 772–779. [CrossRef]
35. Bartlett, D.; Clough, J.; Godwin, J.; Hall, A.; Hamer, M.; Parr-Dobrzanski, B. Review: The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* **2004**, *60*, 309. [CrossRef]
36. Horsfield, A.; Wicks, T.; Wilson, D. Field evaluation of fungicides for the control of rust, brown rot, shot hole and scab in almonds. *Australas. Plant Pathol.* **2010**, *39*, 112–119. [CrossRef]
37. Ojiambo, P.; Paul, P.A.; Holmes, G.J. A quantitative review of fungicide efficacy for managing downy Mildew in Cucurbits. *Phytopathology* **2010**, *100*, 1066–1076. [CrossRef]
38. Ashkan, M.; Assadi, P. Red blotch of almond (*Polystigma ochraceum*) in Iran. *Iran. J. Plant Pathol.* **1974**, *10*, 49–63.



**Airborne inoculum dynamics of *Polystigma amygdalinum* and progression of almond red leaf blotch disease in Catalonia, NE Spain**

Pons-Solé G., Miarnau X., Torguet L., Lázaro E., Vicent A., Luque J.  
*Annals of Applied Biology* (2023) 183, 33-42



# Airborne inoculum dynamics of *Polystigma amygdalinum* and progression of almond red leaf blotch disease in Catalonia, NE Spain

Gemma Pons-Solé<sup>1,2</sup>  | Xavier Miarnau<sup>3</sup>  | Laura Torguet<sup>3</sup>  |  
Elena Lázaro<sup>4</sup>  | Antonio Vicent<sup>4</sup>  | Jordi Luque<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Plant Physiology Laboratory, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain

<sup>2</sup>Sustainable Plant Protection, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) Cabrls, Cabrls, Spain

<sup>3</sup>Fruit Production Program, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) Fruitcentre, PCITAL, Park of Gardeny, Lleida, Spain

<sup>4</sup>Centre de Protecció Vegetal i Biotecnologia, Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA), Moncada, Spain

## Correspondence

Gemma Pons-Solé, Plant Physiology Laboratory, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Spain.  
Email: [gemmapons1992@gmail.com](mailto:gemmapons1992@gmail.com)

## Funding information

Agencia Estatal de Investigación, Grant/Award Number: PID2020-114648RR-C31; Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Spain, Grant/Award Number: RTA2017-00009-C04-01

## Abstract

The dynamics of airborne ascospores and disease progress of red leaf blotch (RLB) of almond, caused by *Polystigma amygdalinum*, and their correlations with weather variables were studied from 2019 to 2021 in two almond orchards located in Lleida, NE Spain. Airborne ascospores were detected and quantified by real-time qPCR using species-specific primers for *P. amygdalinum*. Ascospores were detected mainly from April to June, with a high variability between the yearly cumulative concentrations. Positive significant correlations were found between the weekly proportion of airborne ascospores and the number of wet and mild days—either combined or separated—accumulated rainfall, number of rainy days, accumulated low temperatures on wet days, and mean and maximum relative humidity. In contrast, several thermal variables (maximum temperature, VPD, and number of warm days) were negatively correlated with ascospore catches. Positive significant correlations were found between the cumulative proportion of ascospores and RLB incidence and severity. Weekly variations in RLB incidence and severity showed significant positive correlations with the number of warm days while negative with the number of mild days. Severity was also positively correlated with several thermal variables (mean, maximum, and minimum temperature, and VPD), and negatively correlated with the number of cold days and wet and mild days. Stronger correlations were generally found with ascospore catches or disease progress when using concurrent weekly weather data. Gompertz, monomolecular, and logistic growth models were evaluated to describe RLB disease progress.

## KEYWORDS

almond, disease progress, epidemiology, *Polystigma amygdalinum*, *Prunus dulcis*, quantitative PCR, red leaf blotch disease

## 1 | INTRODUCTION

Red leaf blotch (RLB), caused by the fungus *Polystigma amygdalinum* P.F. Cannon, is one of the most important foliar diseases affecting

almond trees (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) in the Mediterranean Basin and Middle East regions (Cannon, 1996; Farr & Rossman, 2022). The disease is endemic in these regions and so far not known in other almond-growing areas, such as the United States or Australia (Farr &

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Annals of Applied Biology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Association of Applied Biologists.



Rossman, 2022). RLB is widespread in Spain (Tuset & Portilla, 1987) and its incidence has worryingly increased in recent years (Miarnau et al., 2021). This increase has been associated to the expansion of almond-growing areas to inland regions with climatic conditions more suitable for the disease development, the change towards intensive plantations with irrigation and high tree densities, and the use of some late-flowering cultivars (especially 'Guara') that are more susceptible to RLB than traditional ones (Almacellas, 2014; Miarnau et al., 2021; Ollero-Lara et al., 2019).

*Polystigma amygdalinum* is a biotrophic ascomycete specific to almond, which was firstly described in 1843 in France as *Septoria rubra* var. *amygdali* Desm. from almond leaves (Desmazières, 1843). The fungus was reclassified within the genus *Polystigma* and named for decades as *P. ochraceum* (Fr.) Sacc. (= *P. fulvum* (Pers.) DC.), until its identity and currently valid name were established by Cannon (1996) as *P. amygdalinum*. This species differs from other *Polystigma* species due to its host specificity, and stromal and ascospore morphological characteristics (Cannon, 1996).

First RLB symptoms usually appear in spring as pale yellowish spots on both leaf sides, turning into orange-reddish and finally becoming dark brown. Spots size increases with time and may cover almost the whole leaf surface in late summer. In the case of severe infections, early defoliation can be observed in summer (Cannon, 1996; Habibi & Banihashemi, 2016; Shabi, 1997), with a subsequent decrease in tree photosynthetic activity and a reduction in yield in following seasons (López-López et al., 2016). The RLB disease is monocyclic and the only inoculum sources are the perithecia located in the stromata of fallen overwintered leaves (Banihashemi, 1990; Ghazanfari & Banihashemi, 1976). The sexual stage is developed in winter and ascospores are released and air-spread mainly in spring to eventually infect new almond leaves under suitable weather conditions. Following infections, leaf spots appear after a relatively long incubation period of 30–40 days (Banihashemi, 1990; Saad & Masannat, 1997), and eventually up to 10 weeks (Zúñiga et al., 2020). The occurrence of secondary infections has not been confirmed since conidia—mostly produced in summer—are not infective and presumed to act as spermatia in the sexual reproduction of *P. amygdalinum* (Habibi & Banihashemi, 2016; Saad & Masannat, 1997).

RLB control is based on three main strategies: cultural practices to reduce the inoculum source, the use of tolerant cultivars, and the application of fungicides. The most applied cultural practices are to remove or burn the leaf litter in autumn or winter, or to favour its decomposition through urea applications (Almacellas, 2014; Cannon, 1996; López-Moral et al., 2022). Regarding RLB control with fungicides, in-season applications from petal fall to the end of summer have been proved to reduce infections, while evaluations on products efficacy have been conducted mostly in Iran (Banihashemi, 1990; Baytork et al., 2014) and Spain (Torguet et al., 2022).

Research on the biology of *P. amygdalinum* and the RLB epidemiology has been conducted since the early 1970 decade in several countries including Iran, Israel, Lebanon, and Spain, among others. The main research topics included the study of the ascocarp development and maturation (Banihashemi, 1990; Ghazanfari & Banihashemi, 1976;

Saad & Masannat, 1997; Zúñiga et al., 2020), ascospore germination (Banihashemi, 1990; Habibi & Banihashemi, 2015; Zúñiga et al., 2020) and release (Banihashemi, 1990; Saad & Masannat, 1997; Sahragard et al., 2007), the subsequent infection and latency incubation periods (Banihashemi, 1990; Sahragard et al., 2007; Zúñiga et al., 2020), and the overall disease progress in different almond cultivars (Miarnau et al., 2021). Most of these works were conducted under field conditions and explored the relationships between weather variables and the pathogen-related variables under study.

Regarding the inoculum dynamics of *P. amygdalinum*, ascospore production and release have been studied in Iran (Banihashemi, 1990; Ghazanfari & Banihashemi, 1976; Sahragard et al., 2007) and Lebanon (Saad & Masannat, 1997). According to Ghazanfari and Banihashemi (1976), perithecia maturation start at around 10°C in winter. Banihashemi (1990) showed that ascospore release began at blooming (early March in the studied cultivar) and continued for 4–5 weeks, reaching the maximum at petal fall. In Lebanon, ascospore release occurs between February and mid-May (Saad & Masannat, 1997). Little information is available on *P. amygdalinum* ascospore production and release in Spain. Zúñiga et al. (2020) reported on the seasonal evolution of ascocarp maturation and production of ascospores, but no information on ascospore release and dispersal is available. Therefore, quantitative information on the dynamics of the airborne inoculum of *P. amygdalinum* remains to be investigated.

Thus, the main objectives of this study were: (i) to describe the dynamics of *P. amygdalinum* airborne ascospores over a 3-year period in NE Spain using spore traps coupled with qPCR-based methods, (ii) to explore the correlations between ascospore catches and weather variables, (iii) to model the RLB disease progress over time, and (iv) to explore the correlations of disease progress with weather variables and ascospore catches.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Experimental orchards

Experiments were conducted from 2019 to 2021 in two almond orchards located in Lleida region, NE Spain: Les Borges Blanques (Borges hereafter; UTM coordinates: WGS84 Datum, 31T  $x = 320,870$ ,  $y = 4,597,530$ ), and Vilagrassa ( $x = 341,313$ ,  $y = 4,612,125$ ). The orchard at Borges is an experimental plot planted in 2009 as bare root trees with 21 cultivars grafted onto 'INRA GF-677' rootstock, pruned as a central axis, and with a tree spacing of 4 m  $\times$  2 m. The orchard at Vilagrassa is a commercial plot of 'Tarraco', a late-blooming cultivar (Vargas et al., 2008), grafted onto 'INRA GF 677' rootstock, planted in 2007, pruned as open-vase, and with a tree spacing of 7 m  $\times$  6 m. In both orchards, RLB disease occurs naturally (Miarnau et al., 2021). Orchards were drip irrigated, and pruning, soil management, and fertilization were based on the Spanish Integrated Production Management practices (BOE, 2002). No fungicide treatments were applied during the experimental period in either of the two orchards.

## 2.2 | Airborne inoculum dynamics

A Hirst 7-day recording volumetric spore trap (Burkard Manufacturing Co. Ltd., Rickmansworth, Hertfordshire, England) was placed in a central position in each orchard, under 'Tarraco' trees, a highly susceptible cultivar to RLB (Miarnau et al., 2021). Spore traps operated with an airflow of 10 L min<sup>-1</sup> from mid-February (weeks 7–8) to mid-September (weeks 36–37) 2019–2021. This experimental period corresponds, in the case of 'Tarraco' cultivar, from BBCH phenological stage 51–81 (Sakar et al., 2019).

Airborne particles were captured on a Melinex<sup>®</sup> 200 gauge (TEKRA, New Berlin, WI, USA) clear plastic tape, rotating at 2 mm h<sup>-1</sup>, which was previously coated with a layer of silicone solution (Lanzoni, Bologna, Italy). Tapes were replaced weekly and cut into 1-day sections to estimate the daily airborne ascospore concentration of *P. amygdalinum*, according to the molecular methods described by Zúñiga et al. (2018). Total DNA was extracted from each daily tape section using the E.Z.N.A<sup>®</sup> Plant DNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA). Next, a real-time quantitative PCR (qPCR) in a Stepone<sup>™</sup> Real-Time PCR System thermal cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was conducted, using the *P. amygdalinum* specific primer pair Pamy12F4/Pamy12R2 and the optimized reaction conditions described by Zúñiga et al. (2018). Three technical replicates for each biological sample were analysed, and a sterile HPLC-quality water template was used as a negative control. The ascospore quantification was done by fitting the obtained C<sub>q</sub> values to a standard curve formula (with intercept = 34.26 and slope = 3.349), obtained previously by Zúñiga et al. (2018) from a dilution series of a *P. amygdalinum* ascospore suspension placed on plastic tapes. Daily concentration of ascospores was then calculated considering the daily air volume sunk by the spore trap and expressed as ascospores m<sup>-3</sup> day<sup>-1</sup>. For the statistical analysis, we calculated the weekly proportion (0–1) of ascospores based on the cumulative concentration of ascospores caught by the spore traps in each orchard and year.

## 2.3 | Disease progress

Disease symptom progression was evaluated on three 'Tarraco' trees located nearby the spore trap in each orchard. RLB incidence and severity were evaluated on a weekly basis, from March to September 2021, corresponding from BBCH phenological stage 59 to 81 in the studied cultivar. On each tree, 50 fully expanded leaves were arbitrarily selected from new shoots, at different heights and orientations on the outer canopy, and visually assessed. Disease incidence and severity were evaluated according to procedures described by Miarnau et al. (2021). RLB incidence was recorded as the percentage of leaves showing at least one identifiable RLB lesion regardless of its size, whereas RLB severity was estimated from the mean percentage of affected leaf surface, by classifying leaves into the following category classes: class 0 (0% affected leaf surface), 1 (1%–10%), 2 (11%–20%), 3 (21%–50%), and 4 (>50%).

## 2.4 | Weather data

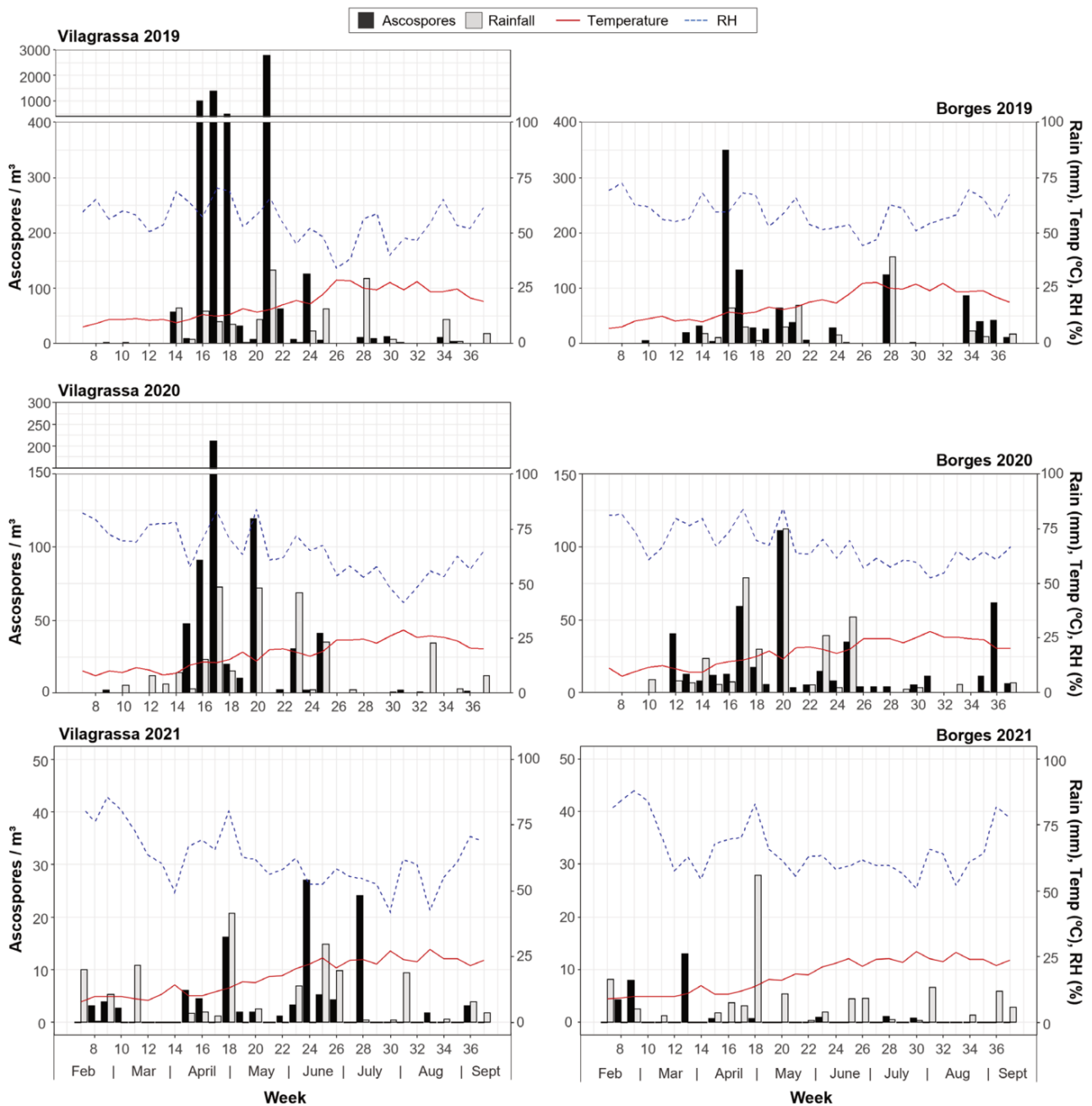
Daily weather data (accumulated rainfall, mean and maximum relative humidity, and mean, minimum, and maximum temperature) were monitored during the experimental period in both orchards by automatic weather stations belonging to the Meteorological Service of Catalonia (MeteoCat; <https://ruralcat.gencat.cat/web/guest/agrometeo.estacions>). The meteorological station at Borges was located about 250 m away from the orchard. The nearest weather station to the Vilagrassa orchard was located about 6 km away, in Tàrrrega (x = 347,015, y = 4,614,430). Additional derived variables were calculated, coming to a total of 14 weather variables (Table 1). These variables were summarized on a weekly basis (Table S1).

## 2.5 | Data analysis

The correlations of current and past weather conditions with the ascospore catches of *P. amygdalinum* in the study period 2019–2021 were evaluated. Spearman's correlation coefficients ( $\rho$ ) were calculated between the weekly proportion of ascospores caught by the spore trap and the values of the 14 weather variables for the same concurrent week, as well as for 1 and 2 weeks before. Spearman's correlation coefficients were also calculated between these weather variables and the weekly increase in RLB incidence and severity in 2021, as well as between RLB incidence and severity levels and the cumulative proportion of ascospores. Additionally, Spearman's correlation coefficients were calculated among weather variables

**TABLE 1** Name and description of the studied weather variables.

Variable	Description
Temp.mean	Mean daily temperature (°C)
Temp.max	Mean maximum daily temperature (°C)
Temp.min	Mean minimum daily temperature (°C)
Rh.mean	Mean daily relative humidity (%)
Rh.max	Mean maximum daily relative humidity (%)
Rain	Accumulated rainfall (mm)
Rain.days	Number of rainy days (with Rain ≥0.2 mm)
VPD	Accumulated vapour pressure deficit (hPa), calculated as described by Rossi et al. (2009): $VPD = (1 - Rh.mean/100) \times 6.11 \times \exp [(17.47 \times Temp.mean)/(239 + Temp.mean)]$
Wet.days	Number of wet days (with VPD ≤0.4 hPa or Rain ≥0.2 mm)
Low.temp.wet	Accumulated low temperatures in wet days, measured as the sum of (50 - Temp.mean) only in wet days
Cold.days	Number of cold days (with Temp.mean < 10°C)
Mild.days	Number of mild days (with Temp.mean ≥ 10°C and < 20°C)
Warm.days	Number of warm days (with Temp.mean ≥ 20°C)
Wet.mild.days	Number of days both wet and mild



**FIGURE 1** Weekly quantifications of airborne ascospores of *Polystigma amygdalinum* (black bars) in Vilagrassa and Borges orchards from 2019 to 2021. Grey bars, solid lines, and dashed lines depict the weekly accumulated rainfall, mean temperature, and mean relative humidity, respectively.

(Figure S1). All correlation analyses were implemented using the function *rcorr* of the ‘Hmisc’ package in the R software version 4.0.2 (R Core Team, 2020).

Disease growth models (namely, Gompertz, monomolecular, and logistic) were fitted separately for each orchard using nonlinear regression for RLB incidence mean data against days after disease onset. Models' equations were  $y_t = K \times \exp[-y_0 \times \exp(-r \times t)]$  for Gompertz,  $y_t = K[1 - y_0 \times \exp(-r \times t)]$  for monomolecular, and

$y_t = K/[1 + y_0 \times \exp(-r \times t)]$  for logistic, in which  $y_t$  is disease incidence at a given time,  $y_0$  is initial disease incidence,  $r$  is disease increase rate,  $K$  is disease maximum incidence, and  $t$  is time in days. To check models' goodness-of-fit, the pseudo-coefficient of determination (pseudo- $R^2$ ), the residual standard error (RSE), and Lin's concordance correlation coefficient (CCC) (Lin, 1989) were calculated. All analyses were implemented using the function *fit\_nlin2* of the R package ‘epifitter’ (Alves & Del Ponte, 2021).

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Airborne inoculum dynamics

We detected and quantified *P. amygdalinum* airborne ascospores in both orchards for the three monitored years (Figure 1). The earliest seasonal detections were on 17 February 2021 in both orchards. The latest seasonal detections were on 15 September 2019 and 3 September 2021 for Borges and Vilagrassa, respectively. In Borges, the yearly cumulative concentrations of ascospores in 2019, 2020, and 2021 were 1042.5, 505.9, and 29.5 ascospores  $m^{-3}$ , respectively; while in Vilagrassa were 6043.8, 580.5, and 110.5 ascospores  $m^{-3}$ . Considering the weekly cumulative proportion of ascospores (Figure 2), in Vilagrassa most ascospores (>75%) were collected between weeks 20 and 28, that is, from May to July, in the monitored years. In Borges, the period of major ascospore catches was more extended than in Vilagrassa, and the 75% of ascospore catches was reached between weeks 28 and 35 (from July to August) in 2019 and 2020. However, in Borges in 2021, 85% of ascospores were already caught in week 13, corresponding to the end of March.

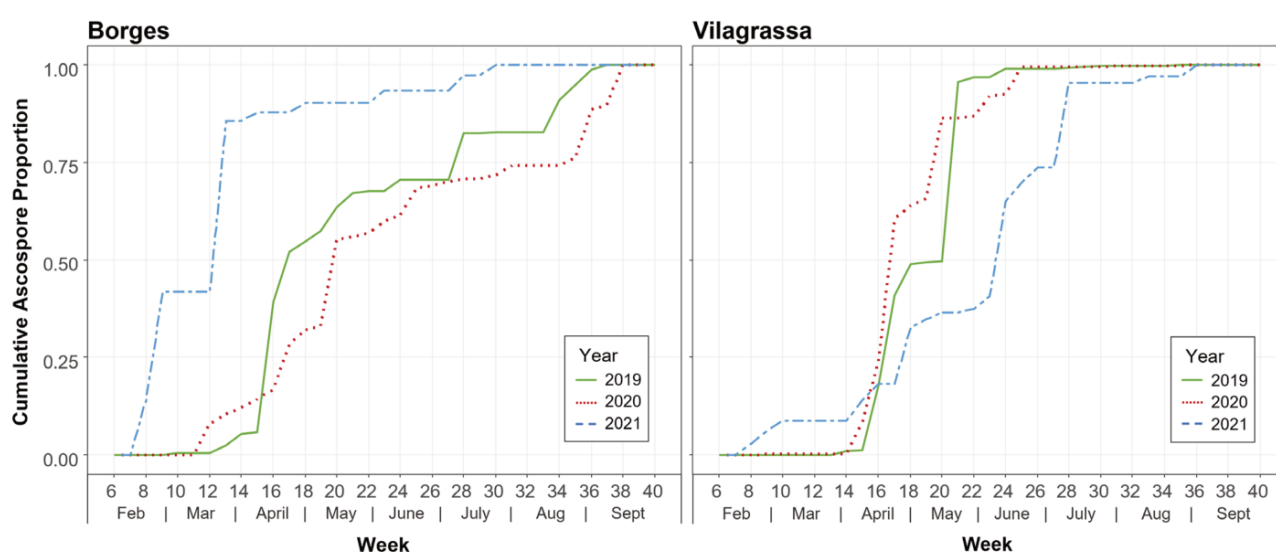
In Borges, mean weekly temperatures of the experimental period each year ranged from 7.5 to 27.5°C in 2019, from 7.7 to 27.9°C in 2020, and from 9.2 to 26.8°C in 2021; mean weekly relative humidity ranged from 44.3% to 72.6% in 2019, from 52.4% to 84.3% in 2020, and from 50.9% to 87.9% in 2021; and accumulated rainfall in the experimental period was 110.3 mm in 2019, 263.9 mm in 2020, and 143.8 mm in 2021. In Vilagrassa, mean weekly temperatures of the experimental period each year ranged from 9.0 to 28.7°C in 2019, from 7.9 to 29.0°C in 2020, and from 8.3 to 27.6°C in 2021; mean weekly relative humidity ranged from 34.0% to 70.3% in 2019, from 41.6% to 83.6% in 2020, and from 42.0% to 85.7% in

2021; and accumulated rainfall in the experimental period was 162.7 mm in 2019, 372.3 mm in 2020, and 183.6 mm in 2021 (Table S1).

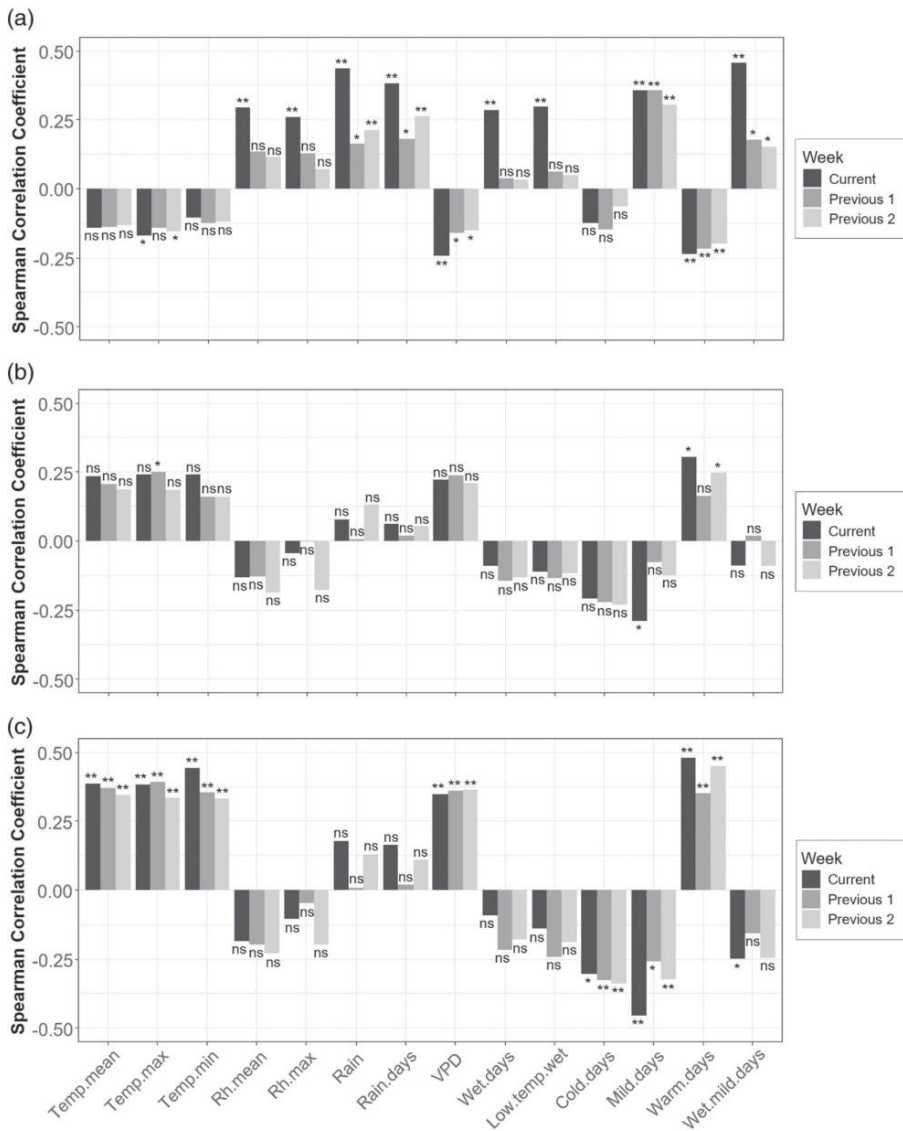
We generally found stronger correlations with the weekly proportion of ascospores when considering the concurrent weather data, as compared to those involving past weather data from 1 or 2 weeks before (Figure 3a and Table S2). We observed that ascospore catches were significantly correlated ( $p < .05$ ) with 11 of the 14 studied weather variables with concurrent data. Positive significant correlations were found between the weekly proportion of airborne ascospores and the number of wet and mild days (either combined or separated), the accumulated rainfall, the number of rainy days, accumulated low temperatures on wet days, and the relative humidity (mean and maximum), in decreasing order of strength ( $0.46 \geq \rho(df = 172) \geq 0.26$ , all  $p < .01$ ). Negative significant correlations were found for accumulated vapour pressure deficit (VPD), the number of warm days, and maximum temperature, in decreasing order of strength ( $-0.24 \leq \rho(172) \leq -0.17$ , all  $p < .05$ ). Several thermal variables (mean, maximum, and minimum temperature, VPD, and number of warm days) were highly positively intercorrelated (Figure S1).

#### 3.2 | Disease progress

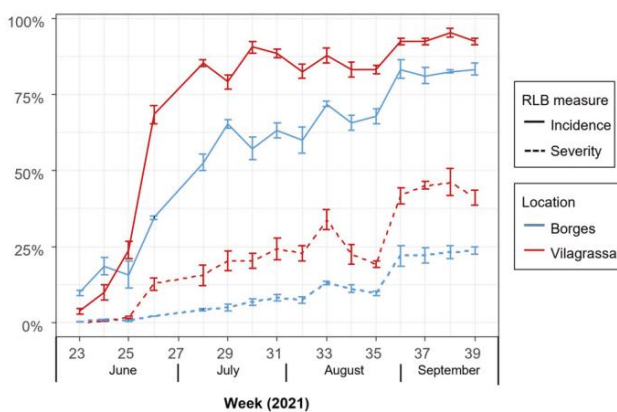
First RLB symptoms in 2021 were observed on 2 June (week 23, Figure 4) in both orchards. The main increase in disease incidence was observed between weeks 25 and 29 (mid-June to mid-July, BBCH phenological stage 81). RLB incidence and severity reached higher values in Vilagrassa, with maximum values of 95% and 46% respectively, than in Borges, with maximum values of 83% and 24%. In both orchards, we occasionally registered a decrease in RLB incidence and severity from mid-July on. Positive significant



**FIGURE 2** Weekly cumulative proportion of *Polystigma amygdalinum* airborne ascospores in Borges and Vilagrassa orchards within the season's growth periods of 2019–2021.



**FIGURE 3** Spearman's rank correlation coefficients between the values of 14 weather variables for the current week, 1 week before (Previous 1), and 2 weeks before (Previous 2) and (a) the weekly proportion of *Polystigma amygdalinum* ascospores caught within season's growth periods of 2019–2021, (b) the weekly increase in the red leaf blotch incidence, and (c) severity in 2021. \*\* and \* indicate significance at  $p < .01$  and 0.05, respectively; ns indicates no significance.



**FIGURE 4** Seasonal disease progress of the almond red leaf blotch from June (detection of the first symptoms) to September 2021 in Borges and Vilagrassa, expressed as the mean incidence and severity values ( $\pm$ standard errors).

correlations were found between the cumulative proportion of ascospores, and RLB incidence and severity ( $\rho(62) = 0.81$  and  $\rho(62) = 0.82$ , respectively, both  $p < .01$ ).

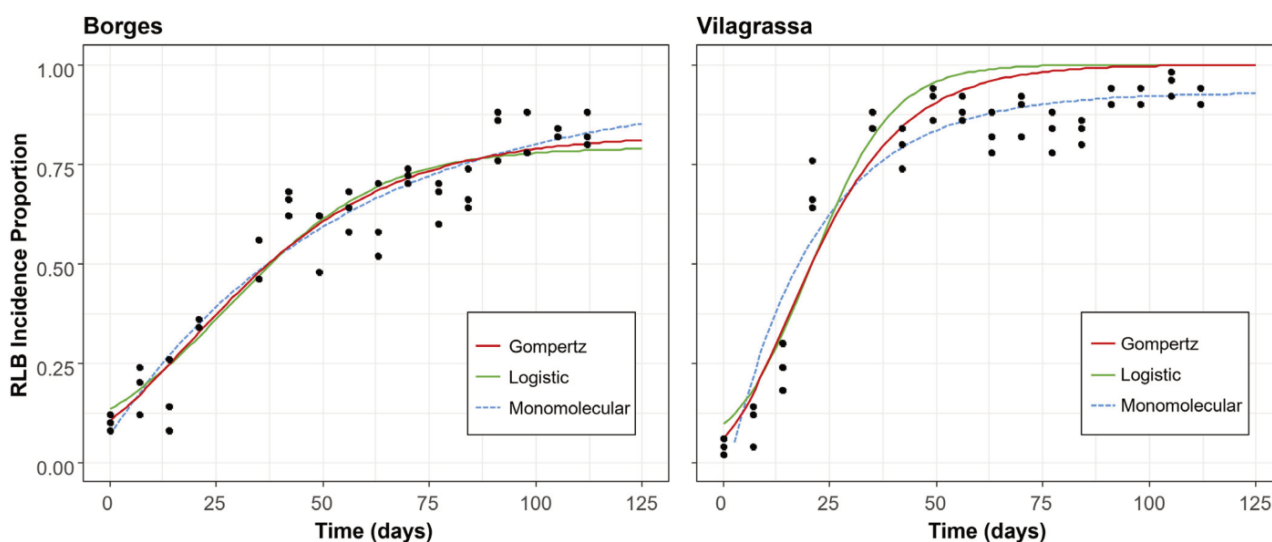
Regarding the association between either current and past weather conditions and the weekly increase in RLB incidence (Figure 3b and Table S2) or severity (Figure 3c, Table S2), we generally found stronger correlations when using the concurrent weather data in the calculations. We observed that the weekly increase in RLB incidence and severity showed significant positive correlations with the number of warm days ( $\rho(62) = 0.31$  and  $\rho(62) = 0.48$ , respectively, all  $p < .05$ ), and negative correlations with the number of mild days ( $\rho(62) = -0.29$  and  $\rho(62) = -0.46$ , respectively, all  $p < .05$ ). Significant correlations were stronger for the increase in RLB severity than for RLB incidence. Additionally, the weekly increase in RLB severity was positively correlated with temperature (minimum, mean, and maximum) and accumulated VPD, in decreasing order of strength ( $0.44 \geq \rho(62) \geq 0.35$ , all  $p < .01$ ), being all

**TABLE 2** Parameter values and goodness-of-fit indexes of the models used to describe the progress of the red leaf blotch disease incidence in Borges and Vilagrassa almond orchards in 2021.

Orchard	Models	Estimated parameters <sup>a</sup>			Goodness of fit <sup>b</sup>		
		$y_0$	$r$	$K$	CCC	pseudo- $R^2$	RSE
Borges	Gompertz	0.105 (0.034)	0.038 (0.007)	0.825 (0.046)	0.972	0.946	0.061
	Monomolecular	0.071 (0.045)	0.018 (0.005)	0.938 (0.096)	0.974	0.948	0.060
	Logistic	0.205 (0.044)	0.031 (0.008)	1 (0.152)	0.945	0.899	0.085
Vilagrassa	Gompertz	0.000 (0.000)	0.217 (0.049)	0.881 (0.016)	0.987	0.977	0.055
	Monomolecular	-0.061 (0.080)	0.047 (0.009)	0.930 (0.040)	0.961	0.925	0.090
	Logistic	0.096 (0.054)	0.107 (0.030)	1 (0.042)	0.939	0.931	0.120

<sup>a</sup> $y_0$ : initial disease incidence;  $r$ : rate of disease increase;  $K$ : maximum disease incidence. Standard errors of the estimated parameters are in parentheses.

<sup>b</sup>CCC: Lin's concordance correlation coefficient; pseudo- $R^2$ : pseudo-coefficient of determination; RSE: residual standard error.

**FIGURE 5** Gompertz, logistic and monomolecular curves (lines) fitted to the red leaf blotch disease progress data (dots) after disease onset in Borges and Vilagrassa in 2021.

these thermal variables highly intercorrelated (Figure S1); and negatively correlated with the number of cold days and the number of wet and mild days ( $\rho(62) = -0.31$  and  $\rho(62) = -0.25$ , respectively, both  $p < .05$ ).

Regarding disease growth models, parameter values and model fit statistics are shown in Table 2, whereas disease progress and equation fitting are plotted in Figure 5. We found that Gompertz, monomolecular, and logistic growth models presented high goodness-of-fit when describing disease progress in both orchards, with Lin's concordance correlation coefficients (CCC) higher than 0.94, residual standard errors (RSE) lower than 0.12, and pseudo- $R^2$  higher than 0.90 in all cases (Table 2). In these models, growth epidemic rate ( $r$ ) was higher in Vilagrassa ( $0.05 \leq r \leq 0.22$ ) than in Borges ( $0.02 \leq r \leq 0.04$ ), while initial disease incidence ( $y_0$ ) was lower in Vilagrassa than in Borges ( $-0.06 \leq y_0 \leq 0.10$ , as compared to  $0.07 \leq y_0 \leq 0.21$ , respectively) (Table 2, Figure 5).

## 4 | DISCUSSION

We have studied the dynamics of airborne ascospores of *P. amygdalinum* and the red leaf blotch disease progression in north-eastern Spain. To the best of our knowledge, this is the first time that the specific qPCR protocol developed by Zúñiga et al. (2018) to detect and quantify *P. amygdalinum* ascospores is implemented in a field study using volumetric air samplers. This molecular method offers advantages over the traditional microscopic morphological quantification of airborne plant pathogens, including shorter processing times and higher specificity and sensitivity for fungal identification and quantification (Dung et al., 2018; González-Domínguez et al., 2020; Marimon et al., 2020).

Previous data about *P. amygdalinum* inoculum development in Spain showed that ascospores were potentially available from January to August (Zúñiga et al., 2020). Consistent with this finding, our

results showed that ascospores of *P. amygdalinum* can be released, depending on the location and the year, from February to mid-September. In other studies conducted in Iran and Lebanon, where ascospores were identified and counted by microscopy techniques, a main period from March to April was reported for ascospore release (Banihashemi, 1990; Saad & Masannat, 1997). Our results describe a wider period of airborne ascospore detection, which could be explained by the different geographical conditions but also by the more sensitive qPCR-based methods used in our study. Most of the ascospores caught in our study (>75%) were already detected from May to July in Vilagrassa, and from July to August in Borges, which in both cases is later than reported in Iran (Banihashemi, 1990; Saad & Masannat, 1997). The wider period of ascospore detection in Borges, compared to Vilagrassa, could be due to the higher mean relative humidity recorded between weeks 27 and 35, corresponding to July and August, in the period 2019–2021 (about 10%–15% higher than in Vilagrassa), that could have extended the period for inoculum depletion to the end of summer. Nevertheless, most of the ascospores in Borges in 2021 were detected before mid-April, which is still consistent with previous findings (Banihashemi, 1990; Saad & Masannat, 1997).

High variability was observed between the yearly cumulative concentration of ascospores across the studied orchards and years, with decreasing values from 2019 to 2021. This could be due to multiple factors, including the RLB incidence in preceding years, the amount of fallen infected leaves from the previous season, or the weather conditions recorded within the period from October to January in the previous season, which influence ascospore production and maturation (Zúñiga et al., 2020), among other factors. No information has been found on the relationship between the amount of *P. amygdalinum* inoculum and the ascospore production and release in the following year. Regarding the weather conditions, the accumulated rainfall in 2020, from April to June, was well over the average records (146% higher than the equivalent average for the decade 2010–2019; own elaboration from MeteoCat database at: <https://ruralcat.gencat.cat/web/guest/agrometeo.estacions>). It is known that convective rain episodes may wash-out airborne particles (Gatz & Dingle, 1970; Rodríguez-Solà et al., 2022), thus resulting in lower ascospore captures in 2020. This might consequently result in less infections in 2020 (not evaluated in this study) and reduce the inoculum and ascospore captures for the next season (2021). It is clear from this study that the relationship between the potential inoculum (i.e. infected fallen leaves) and the airborne ascospore dynamics of the following season should be investigated in further research. Nevertheless, in the correlation analyses we addressed the variability in the yearly cumulative concentration of ascospores by calculating the proportion (0–1) of ascospores at weekly intervals.

Few studies have addressed the relationship between weather conditions and inoculum availability of *P. amygdalinum*. Ghazanfari and Banihashemi (1976) reported that temperatures <10°C in fall and winter are a prerequisite for ascocarp formation and development in *P. amygdalinum*, while Zúñiga et al. (2020) found that seasonal accumulated amounts of available ascospores were positively correlated

with variables related to water availability (maximum relative humidity and accumulated rainfall) and temperatures  $\geq 20^\circ\text{C}$  during the previous fall, mainly in October, and the accumulated rainfall in January. In the present study, we found that the weekly proportion of caught ascospores was correlated with several weather variables of the concurrent week. Some thermal variables (maximum temperature, VPD, and the number of warm days) were negatively correlated with ascospore catches, while the number of mild days (with mean temperatures  $\geq 10$  and  $< 20^\circ\text{C}$ ) and the variables related to humidity and rain were positively correlated. Thus, in general terms, *P. amygdalinum* inoculum release may benefit from mild temperatures and the hydration of fallen leaves. This is consistent with Torguet et al. (2022) observations, who found that when fungicide applications were conducted after >15 mm of rain with 10–15°C as minimum temperature, their efficacy against RLB was comparable to calendar-based treatments, thus suggesting that these conditions are favourable for infections. As similar to our findings, mild temperatures and moisture have been pointed as beneficial for ascospore release in other monocyclic ascomycete pathogens, such as *Plurivorosphaerella nawae* (Hiura & Ikata) O. Hassan & T. Chang (Vicent et al., 2011) or *Taphrina deformans* (Berk.) Tul. (Rossi et al., 2007), causal agents of the persimmon circular leaf spot and the peach leaf curl, respectively.

Regarding RLB disease progress, in 2021 the first symptoms were observed at the beginning of June. This is consistent with previous studies in the same region and with the same cultivar ‘Tarraco’ where, depending on the year, first RLB symptoms developed between the beginning of May and the first half of June (Miarnau et al., 2021), and also coincident with additional previous reports on the disease progress (Banihashemi, 1990; Saad & Masannat, 1997). In our study, RLB incidence and severity progressively increased between mid-June to mid-July. Afterwards, disease intensity remained relatively stable, with some fluctuations that could be due to an early defoliation associated with the disease and the emergence of new leaves (Miarnau et al., 2021). The positive correlation ( $\rho(62) > 0.80$ ) between RLB incidence/severity and the accumulated proportion of ascospores confirms the relationship between airborne ascospore catches and disease progress.

Our study showed positive correlations between the weekly increase in RLB incidence/severity and the number of warm days (with mean temperatures  $\geq 20^\circ\text{C}$ ) in the concurrent week, while negative correlations were found with the number of mild days (with mean temperatures  $\geq 10$  and  $< 20^\circ\text{C}$ ). Disease severity was also positively correlated with the thermal variables mean, maximum, and minimum temperature, and VPD, and negatively correlated with the number of cold days and both wet and mild days. Thus, our results suggest that RLB symptom expression would benefit from concurrent warm temperatures in the studied region, in contrast with ascospore release, that would depend on mild temperatures ( $10 \leq T < 20^\circ\text{C}$ ) and water-related variables. Miarnau et al. (2021) found that the annual RLB incidence was positively correlated with accumulated rainfall in spring, while it was negatively correlated with high temperatures in spring and summer. Zúñiga et al. (2020) suggested that infections occur in spring and summer when mean temperatures are in the range of 10–

20°C. These previous studies are consistent with our results, as we found similar correlations of the same weather variables but with concurrent ascospore catches, which determine subsequent infections and consequently, after the incubation period, the disease expression.

Gompertz, monomolecular and logistic growth models presented all high goodness-of-fit when describing disease progress in both orchards. The monomolecular model has been often used to describe monocyclic diseases (Madden et al., 2007; Pfender, 1982; Vicent et al., 2012), as RLB is. Both Gompertz and logistic models have similar sigmoidal curve shapes and are often used to describe polycyclic epidemics (Madden et al., 2007). Nevertheless, it is not possible to infer the nature of a disease from disease progress curve fitting (Pfender, 1982; Xu, 2006). In the case of the RLB, the only inoculum sources are the perithecia located in the stomata of fallen leaves (Banihashemi, 1990; Zúñiga et al., 2020). Using Gompertz, monomolecular or logistic equations, growth epidemic rate ( $r$ ) was higher in Vilagrassa than in Borges, while initial disease incidence ( $y_0$ ) was lower, regardless of the fitted model. This can be explained because the first RLB register in Borges had a higher incidence than in Vilagrassa, although the progression of the disease was later slower in the case of Borges. Considering RLB as a monocyclic disease, we can then emphasize the importance of RLB control by managing the inoculum source (e.g. through cultural practices) or by predicting its production, release and dispersal dynamics, as the seasonal disease progress depends on tree infections coming from inoculum produced in previous epidemics or in epidemics at other nearby locations (Bergamin-Filho & Amorim, 2002; Madden et al., 2007).

The results of the current research increase the knowledge of *P. amygdalinum* biology and the epidemiology of RLB of almond. The results reported here will contribute to the development of a predictive model for the periods of airborne inoculum availability in the region of Catalonia (NE Spain), that could be incorporated into a decision support system to make RLB management programs more efficient and sustainable.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the technical support from IRTA staff: Dr. Neus Marimon, Guillem Martínez, Robert Oró, Jesús Ortiz, and Lourdes Zazurca. Research was funded by Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Spain, with grant RTA2017-00009-C04-01, and Agencia Estatal de Investigación (AEI), Spain, with grant PID2020-114648RR-C31 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033). G.P. is supported by a predoctoral grant (PRE2018-085207) from AEI. J.L., L.T., and X.M. are supported by the CERCA Program, Generalitat de Catalunya.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no potential conflicts of interest.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are openly available in CORA (Catalan Open Research Area. Repositori de Dades de Recerca) at <https://doi.org/10.34810/data237>

#### ORCID

Gemma Pons-Solé  <https://orcid.org/0000-0001-6582-6987>

Xavier Miarnau  <https://orcid.org/0000-0001-5314-6722>

Laura Torguet  <https://orcid.org/0000-0002-3804-7803>

Elena Lázaro  <https://orcid.org/0000-0003-3821-7769>

Antonio Vicent  <https://orcid.org/0000-0002-3848-0631>

Jordi Luque  <https://orcid.org/0000-0003-0751-9692>

#### REFERENCES

- Almacellas, J. (2014). Síntomas, daños y métodos de control de la mancha ocre del almendro. *Vida Rural*, 389, 28–32.
- Alves, K. S., & Del Ponte, E. M. (2021). Analysis and simulation of plant disease progress curves in R: Introducing the *epifitter* package. *Phytopathology Research*, 3, 22. <https://doi.org/10.1186/s42483-021-00098-7>
- Banihashemi, Z. (1990). Biology and control of *Polystigma ochraceum*, the cause of almond red leaf blotch. *Plant Pathology*, 39, 309–315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02508.x>
- Bayt Tork, D., Taherian, M., & Divan, R. (2014). Evaluation of some fungicides for controlling almond red leaf blotch (*Polystigma amygdalinum*). *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 4, 1011–1016.
- Bergamin-Filho, A., & Amorim, L. (2002). Doenças com período de incubação variável em função da fenologia do hospedeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 561–565. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582002000600001>
- BOE. (2002). Real decreto 1201/2002, de 20 de noviembre, por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas. Boletín Oficial del Estado.
- Cannon, P. F. (1996). Systematics and diversity of the Phyllachoraceae associated with Rosaceae, with a monograph of *Polystigma*. *Mycological Research*, 100, 1409–1427. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80072-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80072-4)
- Desmazières, J. B. H. J. (1843). Dixième notice sur quelques plantes cryptogames, la plupart inédites, récemment découvertes en France, et que vont paraître en nature dans la collection publiée par l'auteur. *Annales des Sciences Naturelles, Séries*, 2(19), 335–373.
- Dung, J. K. S., Scott, J. C., Cheng, Q., Alderman, S. C., Kaur, N., Walenta, D. L., Frost, K. E., & Hamm, P. B. (2018). Detection and quantification of airborne *Claviceps purpurea* sensu lato ascospores from Hirst-type spore traps using real-time quantitative PCR. *Plant Disease*, 102, 2487–2493. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0310-RE>
- Farr, D. F., & Rossman, A. Y. (2022). *Fungal databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA*. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Gatz, D. F., & Dingle, A. N. (1970). Trace substances in rain water: Concentration variations during convective rains, and their interpretation. *Tellus*, 23, 14–27. <https://doi.org/10.3402/tellusa.v23i1.10286>
- Ghazanfari, J., & Banihashemi, Z. (1976). Factors influencing ascocarp formation in *Polystigma ochraceum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66, 401–406. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80208-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80208-2)
- González-Domínguez, E., Berlanas, C., Gramaje, D., Armengol, J., Rossi, V., & Berbegal, M. (2020). Temporal dispersal patterns of *Phaeo- moniella chlamydospora*, causal agent of Petri disease and esca, in vineyards. *Phytopathology*, 110, 1216–1225. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-19-0400-R>
- Habibi, A., & Banihashemi, Z. (2015). Ascospore germination and appressorium formation in vitro of *Polystigma amygdalinum* and its survival period. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 51, 461–469.
- Habibi, A., & Banihashemi, Z. (2016). Mating system and role of pycnidiospores in biology of *Polystigma amygdalinum*, the causal agent of almond red leaf blotch. *Phytopathologia Mediterranea*, 55, 98–108. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-16498](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16498)



- Lin, I.-K. (1989). A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, 45, 255–268. <https://doi.org/10.2307/2532051>
- López-López, M., Calderón, R., González-Dugo, V., Zarco-Tejada, P., & Ferrer, E. (2016). Early detection and quantification of almond red leaf blotch using high-resolution hyperspectral and thermal imagery. *Remote Sensing*, 8, 276. <https://doi.org/10.3390/rs8040276>
- López-Moral, A., Agustí-Brisach, C., Ruiz-Prados, M. D., Lovera, M., Luque, F., Arquero, O., & Trapero, A. (2022). Biological and urea treatments reduce the primary inoculum of red leaf blotch of almond caused by *Polystigma amygdalinum*. *Plant Disease* (in press). <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0957-RE>
- Madden, L. V., Hughes, G., & van den Bosch, F. (2007). *The study of plant disease epidemics*. American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890545058>
- Marimon, N., Eduardo, I., León, M., Berbegal, M., Armengol, J., & Luque, J. (2020). A qPCR-based method for the detection and quantification of the peach powdery mildew (*Podosphaera pannosa*) in epidemiological studies. *European Journal of Plant Pathology*, 158, 1005–1016. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02136-0>
- Miarnau, X., Zazurca, L., Torguet, L., Zúñiga, E., Batlle, I., Alegre, S., & Luque, J. (2021). Cultivar susceptibility and environmental parameters affecting symptom expression of red leaf blotch of almond in Spain. *Plant Disease*, 105, 940–947. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-20-0869-RE>
- Ollero-Lara, A., Agustí-Brisach, C., Lovera, M., Roca, L. F., Arquero, O., & Trapero, A. (2019). Field susceptibility of almond cultivars to the four most common aerial fungal diseases in southern Spain. *Crop Protection*, 121, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.03.005>
- Pfender, W. F. (1982). Monocyclic and polycyclic root diseases. Distinguishing between the nature of the disease cycle and the shape of the disease progress curve. *Phytopathology*, 72, 31–32.
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Rodríguez-Solà, R., Casas-Castillo, M. C., Zhang, J. J. H., Kirchner, R., Alarcón, M., Periago, C., de Linares, C., & Belmonte, J. (2022). A study on correlations between precipitation ETCCDI and airborne pollen/fungal spore parameters in the NE Iberian Peninsula. *International Journal of Biometeorology*, 66, 1173–1187. <https://doi.org/10.1007/s00484-022-02267-5>
- Rossi, V., Bolognesi, M., & Giosuè, S. (2007). Seasonal dynamics of *Taphrina deformans* inoculum in peach orchards. *Phytopathology*, 97, 352–358. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-3-0352>
- Rossi, V., Salinari, F., Patteri, E., Giosuè, S., & Bugiani, R. (2009). Predicting the dynamics of ascospore maturation of *Venturia pirina* based on environmental factors. *Phytopathology*, 99, 453–461. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-4-0453>
- Saad, A. T., & Masannat, K. (1997). Economic importance and cycle of *Polystigma ochraceum*, causing red leaf blotch disease of almond, in Lebanon. *Bulletin OEPP/EPPO*, 27, 481–485. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1997.tb00669.x>
- Sahragard, N., Eshaghi, R., Aflaki, M. R., & Banihashemi, Z. A. D. (2007). Time of fungicide application against *Polystigma amygdalinum* in almond based on ascospore discharge in Chahar Mahal va Bakhtiari province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 43, 219–239.
- Sakar, E. H., El Yamani, M., Boussakouran, A., & Rharrabti, Y. (2019). Codification and description of almond (*Prunus dulcis*) vegetative and reproductive phenology according to the extended BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 247, 224–234. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.024>
- Shabi, E. (1997). Disease management of the almond pathogens *Glomerella cingulata*, *Polystigma ochraceum* and *Tranzschelia pruni-spinosae*. *EPPO Bulletin*, 27, 479–480. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1997.tb00668.x>
- Torguet, L., Zazurca, L., Martínez, G., Pons-Solé, G., Luque, J., & Miarnau, X. (2022). Evaluation of fungicides and application strategies for the management of the red leaf blotch disease of almond. *Horticulturae*, 8, 501. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060501>
- Tuset, J. J., & Portilla, M. T. (1987). Principales alteraciones del almendro causadas por hongos en el área mediterránea española. *Fruticultura Profesional*, 11, 13–17.
- Vargas, F., Romero, M., Clavé, J., Vergés, J., Santos, J., & Batlle, I. (2008). ‘Vayro’, ‘Marinada’, ‘Constantí’, and ‘Tarraco’ almonds. *HortScience*, 43, 535–537. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.2.535>
- Vicent, A., Bassimba, D. D. M., Hinarejos, C., & Mira, J. L. (2012). Inoculum and disease dynamics of circular leaf spot of persimmon caused by *Mycosphaerella nawae* under semi-arid conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 289–299. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9989-1>
- Vicent, A., Bassimba, D. D. M., & Intrigliolo, D. S. (2011). Effects of temperature, water regime and irrigation system on the release of ascospores of *Mycosphaerella nawae*, causal agent of circular leaf spot of persimmon. *Plant Pathology*, 60, 890–908. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02461.x>
- Xu, X. (2006). Modelling and interpreting disease progress in time. In B. Cooke, D. Jones, & B. Kaye (Eds.), *The epidemiology of plant diseases* (pp. 215–238). Springer. [https://doi.org/10.1007/1-4020-4581-6\\_8](https://doi.org/10.1007/1-4020-4581-6_8)
- Zúñiga, E., León, M., Berbegal, M., Armengol, J., & Luque, J. (2018). A qPCR-based method for detection and quantification of *Polystigma amygdalinum*, the cause of red leaf blotch of almond. *Phytopathologia Mediterranea*, 57, 257–268. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-23190](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-23190)
- Zúñiga, E., Romero, J., Ollero-Lara, A., Lovera, M., Arquero, O., Miarnau, X., Torguet, L., Trapero, A., & Luque, J. (2020). Inoculum and infection dynamics of *Polystigma amygdalinum* in almond orchards in Spain. *Plant Disease*, 104, 1239–1246. <https://doi.org/10.1094/pdis-07-19-1406-re>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Pons-Solé, G., Miarnau, X., Torguet, L., Lázaro, E., Vicent, A., & Luque, J. (2023). Airborne inoculum dynamics of *Polystigma amygdalinum* and progression of almond red leaf blotch disease in Catalonia, NE Spain. *Annals of Applied Biology*, 183(1), 33–42. <https://doi.org/10.1111/aab.12831>

**Supporting Information Table S1.** Weekly summary of the monitored weather variables in 2019-2021.

- LOCATION: Borges

Week	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
temp:mean	2019	7.5	10.2	11.3	12.3	10.2	11.1	10.0	12.2	14.2	13.6	14.3	16.5	15.5	16.5	18.8	19.8	18.4	22.4	27.2	27.5	25.1	24.7	26.8	24.0	27.4	23.8	23.4	24.0	20.9
	2020	7.7	9.9	11.6	12.5	10.8	9.4	9.5	13.0	14.5	15.1	16.7	19.1	15.4	20.6	20.9	19.8	17.9	24.6	24.6	24.8	22.9	25.4	27.9	25.3	25.5	24.8	24.3	20.3	
	2021	9.2	9.8	9.8	9.7	9.9	11.0	13.9	10.6	10.7	12.0	13.7	16.2	16.0	18.3	18.0	20.8	22.3	24.2	21.1	23.8	24.1	22.6	26.8	24.0	23.0	26.6	23.8	23.9	21.4
temp:max	2019	17.1	19.6	18.5	20.3	18.7	19.6	16.1	19.4	21.0	18.8	21.6	24.1	23.6	23.2	26.4	27.4	25.4	30.7	36.3	36.4	32.5	31.7	34.9	32.0	34.5	31.2	30.3	31.7	27.7
	2020	15.2	17.7	17.1	19.6	17.1	15.3	14.5	20.3	21.3	20.3	22.8	27.4	20.6	28.4	28.0	27.0	24.3	26.1	32.3	31.7	32.5	30.0	33.5	36.9	33.9	33.6	32.5	31.8	28.2
	2021	16.4	15.1	15.0	16.2	17.2	19.6	23.8	17.7	17.0	18.9	19.2	24.2	22.7	25.1	25.4	28.4	30.7	31.8	28.0	31.5	31.8	30.5	35.5	30.6	30.6	35.3	31.7	31.7	27.9
temp:min	2019	-1.4	1.1	3.1	4.2	1.7	1.4	3.3	4.5	5.9	7.8	6.7	7.7	7.6	9.2	11.1	10.5	11.4	13.1	16.3	17.6	17.6	17.7	18.5	15.4	19.2	16.3	16.8	15.9	14.4
	2020	1.3	1.6	6.3	6.2	4.2	4.1	5.0	5.1	7.6	10.8	10.6	10.7	11.3	12.1	14.7	13.3	12.0	13.5	17.0	17.8	16.7	16.1	16.9	18.2	17.0	18.0	16.4	17.5	12.1
	2021	3.2	4.2	4.8	3.4	2.6	1.5	2.9	2.6	3.9	3.9	9.4	7.4	9.3	10.6	10.1	13.8	13.7	16.0	14.2	15.6	16.4	14.4	16.9	17.0	15.3	18.1	16.4	15.9	15.7
rh:mean	2019	72.6	62.7	62.0	56.4	55.3	56.6	68.0	59.6	59.6	68.0	67.1	53.0	58.6	66.0	53.9	51.6	52.7	53.7	44.3	47.1	62.6	61.4	51.0	54.6	56.1	58.0	69.7	65.7	56.7
	2020	81.6	72.9	60.7	66.6	79.7	76.3	79.7	67.1	73.9	83.9	69.6	67.3	84.3	63.9	63.3	69.9	61.3	69.6	57.0	61.6	57.3	60.7	59.6	52.4	54.7	64.9	60.3	64.6	60.7
	2021	84.0	87.9	84.0	70.6	57.6	62.9	54.3	67.7	69.4	70.0	82.9	65.7	61.6	55.4	62.7	63.3	58.0	59.3	61.7	59.4	59.6	56.4	50.9	65.7	63.9	51.9	61.0	64.0	81.7
rh:max	2019	97.1	91.9	90.1	85.4	87.9	91.4	91.4	88.9	91.7	92.6	96.1	85.3	90.3	94.0	83.0	84.7	80.3	85.4	79.7	81.3	94.0	90.9	84.3	87.9	88.3	87.0	94.1	95.1	84.0
	2020	98.0	96.1	84.6	89.9	99.9	98.9	99.1	99.4	99.1	100	96.7	99.7	99.6	96.6	92.0	96.0	89.0	96.6	91.4	89.1	88.6	92.6	93.1	88.7	86.7	94.3	96.6	92.1	92.7
	2021	100	100	100	97.1	89.6	94.7	92.9	94.3	97.3	99.3	100	100	99.1	85.9	100	94.1	94.3	88.3	91.1	94.7	95.0	90.9	94.9	97.0	98.1	88.6	89.0	100	100
rain	2019	0	0	0	0	0	4.8	2.7	16.3	7.5	1.3	0	7.7	17.2	0	0	3.8	0	0	0.2	39.3	0.2	0.3	0	0	0	0	5.9	3.1	0
	2020	0.3	0	6	0	5.2	4.5	15.6	4	5	52.5	20	0.3	74.8	0	3.7	26.3	2.4	34.7	0	0.1	0	1.5	2.5	0.1	0	3.9	0	0.5	0
	2021	0	5.2	0	2.5	0	0	0	3.5	7.3	6.2	55.6	0	10.7	0	0.8	3.8	0.1	8.8	9.3	0	1.1	0.1	0.6	13.3	0.2	0.1	2.7	0.1	11.8
rain:days	2019	0	0	0	0	0	4	1	2	5	1	0	2	2	0	0	1	0	0	1	3	1	1	0	0	0	0	1	1	0
	2020	1	0	3	0	2	4	1	2	5	2	1	6	0	1	4	2	3	0	0	0	0	2	1	0	0	2	0	1	0
	2021	0	1	0	1	0	0	1	3	2	6	0	3	0	2	1	0	2	2	2	0	2	0	1	2	0	0	1	0	3

	Week	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
VPD	2019	20.0	33.2	36.0	44.2	39.7	40.8	27.8	40.8	47.2	35.6	38.5	62.5	52.0	45.8	71.3	81.2	73.0	89.4	145.1	138.9	85.9	85.4	125.1	96.0	113.8	86.4	64.3	73.0	75.2	
	2020	13.7	23.8	38.7	33.9	18.3	20.1	17.9	35.1	30.7	20.0	42.8	51.9	20.2	62.9	64.6	49.2	55.9	51.4	94.1	83.0	94.1	76.8	92.8	128.0	104.2	82.3	87.9	74.8	65.7	
	2021	13.1	10.6	13.7	25.2	37.1	34.0	51.6	30.2	27.5	29.5	19.2	45.1	49.2	66.1	57.0	64.2	80.1	93.1	68.3	84.2	85.6	84.1	123.5	73.4	71.9	121.6	83.9	75.7	33.1	
wet.days	2019	6	2	1	0	0	1	6	1	2	5	1	0	2	2	0	0	1	0	0	1	3	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	2020	7	5	3	1	7	6	5	1	3	5	3	1	6	0	1	4	2	3	0	0	0	2	1	0	0	2	0	0	1	0
	2021	7	7	7	5	2	1	0	3	4	3	7	0	3	0	2	1	0	2	2	2	0	2	0	1	2	0	0	1	0	3
low.temp.wet	2019	255	82.3	37.8	0	0	40	238	37.2	73.4	184	39.9	0	71.2	65.6	0	0	36.3	0	0	24.7	78.4	26	24.7	0	0	0	0	30.6	28.1	0
	2020	296	202	116	36.5	274	245	207	38.1	109	176	102	33.4	209	0	30.3	121	63.1	92.1	0	0	0	0	52.6	26	0	0	48.8	0	25.8	0
	2021	286	281	282	204	87.3	39.2	0	123	156	115	254	0	101	0	69.8	30.9	0	57.9	60.9	0	53.5	0	22.8	57.3	0	0	29.5	0	88.9	0
cold.days	2019	7	4	2	0	3	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2020	6	3	3	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2021	5	3	3	5	2	1	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mild.days	2019	0	3	5	7	4	7	3	7	7	7	7	7	7	7	5	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
	2020	1	4	4	7	5	4	4	7	7	7	6	5	7	2	2	3	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	2021	2	4	4	2	5	6	7	4	5	7	7	7	7	7	6	5	1	0	1	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
warm.days	2019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	7	5
	2020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	5	5	4	0	4	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	4
	2021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	7	6	5	7	7	6	7	7	7	6	7	7	7	
wet.mild.days	2019	0	0	1	0	0	1	3	1	2	5	1	0	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	2020	1	2	2	1	5	3	2	1	3	5	3	1	6	0	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2021	2	4	4	0	0	1	0	1	3	3	7	0	3	0	2	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

• LOCATION: Vilagrassa

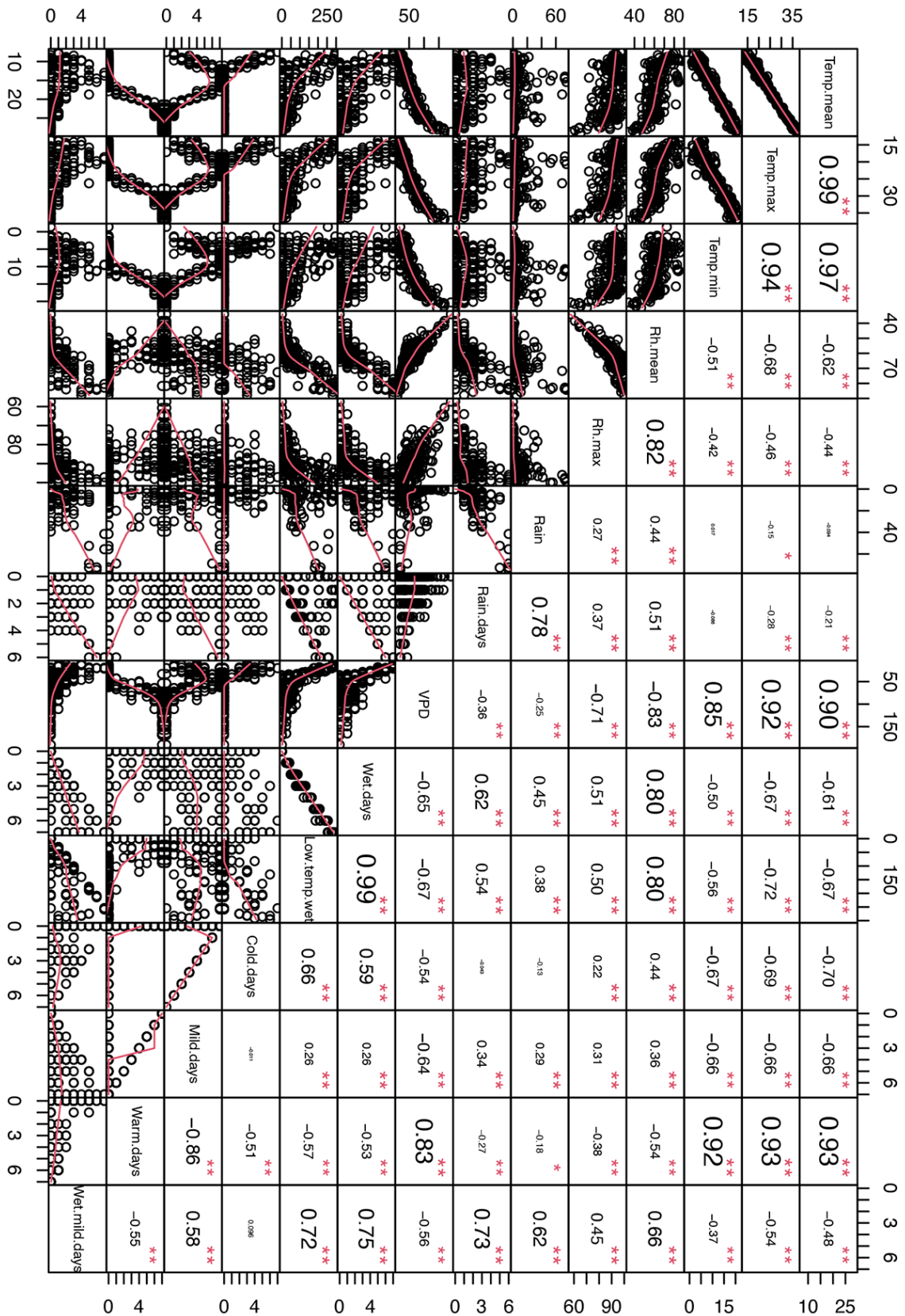
Week	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
temp.mean	2019 9.0	11.1	11.0	11.4	10.5	10.8	9.4	10.8	13.4	12.3	13.2	15.7	14.4	15.6	17.7	19.6	17.8	22.4	28.7	28.3	25.0	24.1	27.7	24.2	28.0	23.7	23.5	24.7	20.7
temp.mean	2020 7.9	10.0	9.4	11.6	10.7	8.4	9.1	12.7	14.2	14.0	15.4	18.8	14.5	20.0	20.3	18.7	16.9	19.3	24.4	24.3	24.6	22.7	26.1	29.0	25.3	26.0	25.4	24.0	20.5
temp.mean	2021 9.8	9.6	9.7	8.8	8.3	10.5	14.3	10.2	10.0	11.7	13.0	15.5	15.1	17.4	17.8	20.3	22.2	24.5	20.5	23.6	23.9	22.1	27.1	23.7	23.0	27.6	24.0	24.0	21.6
temp.max	2019 16.8	18.8	17.6	19.4	18.5	18.8	15.4	18.3	19.8	17.8	20.3	22.9	22.3	22.8	25.7	26.4	24.8	30.4	37.2	36.8	32.3	31.5	35.2	31.6	35.1	30.8	30.4	32.6	27.7
temp.max	2020 13.4	16.2	15.2	17.9	15.8	14.2	13.7	19.3	20.3	18.4	21.7	25.8	19.8	27.3	27.7	26.3	23.7	25.5	31.9	31.6	32.8	29.9	33.6	36.9	33.8	33.3	32.5	31.2	27.8
temp.max	2021 15.0	14.0	13.9	14.6	15.8	18.4	22.8	16.4	16.5	18.9	18.6	23.3	22.0	24.2	24.8	27.6	30.6	32.6	27.5	31.0	31.7	29.8	35.1	30.6	29.8	35.8	31.5	31.2	28.1
temp.min	2019 3.0	4.3	5.2	4.8	3.8	3.8	3.9	4.6	7.9	7.2	7.5	8.2	7.0	9.7	10.4	12.5	11.6	14.9	20.3	20.7	18.6	18.5	20.5	17.1	21.8	17.1	18.1	18.1	14.6
temp.min	2020 3.1	4.5	3.8	5.8	6.3	4.4	5.4	6.6	8.6	10.7	9.9	12.4	11.2	12.8	14.3	12.8	11.3	13.7	17.4	17.7	17.3	16.5	19.5	21.4	18.0	20.1	19.7	17.8	14.3
temp.min	2021 5.9	5.9	6.3	4.0	1.6	3.2	6.8	4.7	5.0	5.3	9.6	8.3	9.0	11.1	11.5	14.0	14.5	18.0	14.3	17.5	16.7	15.2	20.1	17.8	16.8	20.5	17.6	18.3	16.5
rh.mean	2019 65.0	56.3	59.9	58.1	50.9	53.6	68.7	63.6	57.3	70.3	68.9	53.0	58.1	65.7	54.3	45.3	52.1	48.0	34.0	38.4	56.1	59.0	40.0	47.9	46.7	54.3	65.1	53.3	52.0
rh.mean	2020 79.1	72.3	69.6	69.0	77.1	77.3	77.7	57.6	70.4	82.9	70.4	63.3	83.6	60.9	62.0	71.7	65.1	67.4	53.6	58.1	53.0	57.9	47.6	41.6	48.3	55.9	53.4	62.6	56.7
rh.mean	2021 76.1	85.7	80.6	72.7	63.6	60.3	49.6	66.9	69.6	65.6	80.4	62.7	62.0	56.3	58.1	62.6	52.4	52.4	58.3	55.6	54.7	52.6	42.0	62.0	60.0	42.4	55.3	61.0	70.6
rh.max	2019 90.1	78.6	79.4	85.9	75.0	79.9	89.7	91.0	86.4	92.7	93.3	80.9	84.7	91.7	79.9	74.1	78.3	72.6	57.4	60.7	81.4	82.9	64.0	74.4	70.3	82.1	88.4	76.4	75.3
rh.max	2020 93.1	90.7	86.9	89.0	92.9	94.6	93.7	82.3	92.6	97.6	92.6	87.9	98.3	88.9	86.0	96.0	90.3	92.3	83.0	85.9	78.9	83.1	74.0	65.3	73.4	78.3	82.6	92.0	85.7
rh.max	2021 94.6	97.6	94.9	91.0	91.1	86.9	72.0	87.9	91.4	90.6	97.1	89.9	91.3	86.7	87.1	93.1	80.3	75.0	84.6	85.1	87.9	79.7	71.6	88.0	88.7	64.4	79.1	88.7	92.9
rain	2019 0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	16.0	2.0	14.8	9.7	8.7	0.6	11.1	33.4	0.0	0.7	5.8	15.8	0.0	0.0	29.6	0.1	2.0	0.0	0.0	0.0	10.8	1.1	0.0
rain	2020 0.3	0.0	5.4	0.0	11.7	6.4	14.3	3.2	23.1	72.7	15.5	0.0	72.4	0.1	0.0	68.8	2.5	34.7	0.0	2.7	0.0	0.0	0.6	0.0	0.6	34.1	0.0	3.2	0.0
rain	2021 0.4	10.8	0.1	21.9	0.0	0.0	0.0	3.2	4.0	2.6	41.5	0.0	5.2	0.0	0.1	13.9	0.1	29.8	19.7	0.0	0.9	0.2	1.0	19.0	0.2	0.0	1.2	0.2	7.6
rain.days	2019 0	0	1	0	0	0	3	2	2	5	1	1	2	3	0	1	2	1	0	0	3	0	1	0	0	0	1	1	0
rain.days	2020 1	0	3	0	1	2	4	1	3	5	2	0	6	0	0	6	3	2	0	2	0	0	1	0	1	2	0	2	0
rain.days	2021 1	2	0	2	0	0	0	1	3	1	6	0	4	0	0	3	0	2	2	0	1	1	1	2	1	0	1	1	3

	Week	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
VPD	2019	29.0	40.8	37.2	40.2	45.1	43.4	26.2	33.6	46.9	29.9	34.1	59.4	49.4	45.1	67.0	91.1	73.5	101.3	190.3	169.0	101.7	87.6	165.2	112.3	143.9	93.7	75.4	103.9	83.3
	2020	15.6	23.8	25.7	31.0	20.7	17.9	18.7	44.3	33.8	20.1	37.1	56.8	19.6	67.8	64.6	43.4	47.9	53.8	100.7	89.7	103.5	81.4	127.0	167.8	122.1	108.5	108.2	78.8	73.8
	2021	21.3	12.4	16.4	22.0	28.5	35.6	57.9	29.5	26.3	33.6	21.1	47.2	46.0	61.2	63.5	63.0	90.9	110.9	71.9	92.1	94.9	89.9	149.2	80.3	79.6	157.0	101.1	83.0	53.6
wet.days	2019	5	0	1	0	0	0	4	2	2	2	5	1	2	3	0	1	2	1	0	0	3	0	1	0	0	0	1	1	0
	2020	7	6	6	4	7	7	5	1	3	5	2	0	6	0	0	6	3	2	0	2	0	0	1	0	1	2	0	2	0
	2021	5	7	7	5	3	0	0	3	5	3	7	0	4	0	0	3	0	2	2	0	1	1	1	2	1	0	1	1	3
low.temp.wet	2019	208	0	39.1	0	0	0	165	80.4	74.7	189	40.9	32.2	73.5	104	0	33	69.7	29.9	0	0	78.2	0	24.1	0	0	0	30.8	27.7	0
	2020	295	239	246	159	275	291	209	38.3	109	182	71.8	0	214	0	0	187	103	66	0	53.7	0	0	24.4	0	27.7	51.4	0	57	0
	2021	203	283	282	207	131	0	0	122	200	116	259	0	140	0	0	89.6	0	58.2	61.8	0	27.5	24.3	22.7	57.7	26.1	0	29.5	27.5	87.5
cold.days	2019	5	1	2	2	4	4	5	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2020	6	4	4	2	2	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2021	3	3	6	4	6	3	0	3	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mild.days	2019	2	6	5	5	3	3	2	6	7	7	6	7	7	7	6	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
	2020	1	3	3	5	5	3	2	7	7	7	7	6	7	3	3	6	7	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
	2021	4	4	1	3	1	4	7	4	4	4	6	7	7	7	6	5	2	0	1	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0
warm.days	2019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	3	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	7	5
	2020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	4	1	0	3	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	5
	2021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	5	7	6	5	7	7	6	7	7	6	7	7	7	7
wet.mild.days	2019	0	0	1	0	0	0	0	1	2	5	0	1	2	3	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	2020	1	3	2	2	5	3	0	1	3	5	2	0	6	0	0	5	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	2021	2	4	1	2	0	0	0	1	3	3	7	0	4	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Supporting Information Table S2.** Spearman's rank correlation coefficients between 14 weather variables for the concurrent week, one week before (Previous 1), or two weeks before (Previous 2), and the weekly proportion of *P. amygdalinum* ascospores caught by the spore trap in the period 2019-2021, and the weekly increase on RLB incidence and severity in 2021.

	<i>temp.mean</i>	<i>temp.max</i>	<i>temp.min</i>	<i>rh.mean</i>	<i>rh.max</i>	<i>rain</i>	<i>rain.days</i>	<i>VPD</i>	<i>wet.days</i>	<i>low.temp.wet</i>	<i>cold.days</i>	<i>mild.days</i>	<i>warm.days</i>	<i>wet.mild.days</i>
Ascospores 2019-2021	Current	-0.141	-0.169*	-0.103	<b>0.295**</b>	<b>0.261**</b>	<b>0.437**</b>	<b>0.384**</b>	<b>-0.242**</b>	<b>0.287**</b>	-0.121	<b>0.359**</b>	<b>-0.234**</b>	<b>0.457**</b>
	Previous 1	-0.138	-0.14	-0.123	0.133	0.128	<b>0.163*</b>	<b>0.183*</b>	-0.161*	0.039	-0.147	<b>0.357**</b>	<b>-0.217**</b>	<b>0.179*</b>
	Previous 2	-0.132	<b>-0.153*</b>	-0.119	0.115	0.07	<b>0.214**</b>	<b>0.264**</b>	<b>-0.152*</b>	0.034	0.051	-0.062	<b>0.304**</b>	<b>-0.199**</b>
RLB incidence 2021	Current	0.236	0.24	0.241	-0.131	-0.044	0.078	0.061	0.222	-0.091	-0.206	<b>-0.288*</b>	<b>0.305*</b>	-0.087
	Previous 1	0.208	<b>0.251*</b>	0.161	-0.129	-0.001	0.007	0.02	0.24	-0.146	-0.221	-0.075	0.164	0.017
	Previous 2	0.188	0.186	0.16	-0.184	-0.176	0.131	0.052	0.21	-0.132	-0.229	-0.121	<b>0.247*</b>	-0.091
RLB severity 2021	Current	<b>0.386**</b>	<b>0.383**</b>	<b>0.442**</b>	-0.185	-0.105	0.178	0.163	<b>0.349**</b>	-0.091	<b>-0.305*</b>	<b>-0.455**</b>	<b>0.480**</b>	<b>-0.250*</b>
	Previous 1	<b>0.370**</b>	<b>0.391**</b>	<b>0.353**</b>	-0.198	-0.048	0.01	0.017	<b>0.352**</b>	-0.216	<b>-0.328**</b>	<b>-0.257*</b>	<b>0.351**</b>	-0.157
	Previous 2	<b>0.346**</b>	<b>0.335**</b>	<b>0.333**</b>	-0.23	-0.197	0.13	0.109	<b>0.363**</b>	-0.18	<b>-0.339**</b>	<b>-0.325**</b>	<b>0.448**</b>	-0.244

**Supporting information Figure S1.** Correlogram of Spearman's rank correlation coefficients between the studied weather variables in the period 2019–2021. \*\* and \* indicate significance at  $p < .01$  and  $.05$ , respectively.







## **Discussió general**

---



## Discussió general

La taca ocre de l'ametller és actualment una de les malalties foliars de l'ametller més preocupants en la conca mediterrània i, particularment, a Espanya (Ollero-Lara *et al.*, 2019). La seva incidència ha experimentat un augment en les últimes dècades, el que s'associa amb l'expansió del cultiu cap a nous emplaçaments i amb l'adopció de models de producció més intensius. A més, i tenint en compte que algunes de les cultivars d'ametller més plantades a Espanya en l'actualitat, com 'Guara' i 'Marinada', són molt susceptibles a la taca ocre, el control químic és la estratègia ara per ara més emprada per fer front a aquesta malaltia (Miarnau *et al.*, 2021; MAPA, 2023a). Tanmateix, l'ús indiscriminat de fungicides té un impacte negatiu sobre el medi ambient, així com en la salut humana (Budzinski i Couderchet, 2018; Zubrod *et al.*, 2019), motiu pel qual la Comissió Europea aprovà la Directiva 2009/128/EC per establir un marc d'actuació comunitària per l'ús sostenible dels pesticides, tot promovent els principis de la gestió integrada de plagues (GIP) (European Commission, 2009a).

En aquest context, la present tesi doctoral planteja l'objectiu d'optimitzar les estratègies de control de la taca ocre de l'ametller, mitjançant el coneixement de l'epidemiologia del patogen i la seva modelització. En primer lloc, hem avaluat l'eficàcia d'una àmplia gamma de productes fungicides, així com de diverses estratègies d'aplicació, en el control de la taca ocre en condicions de camp (Capítol 1; Torguet *et al.*, 2022). A continuació, hem estudiat diferents aspectes clau de l'epidemiologia de *P. amygdalinum* sota les condicions de cultiu de la zona de Lleida, amb un interès especial en les relacions entre variables meteorològiques i l'aerobiologia de l'inòcul primari (Capítol 2; Pons-Solé *et al.*, 2023). Finalment, hem desenvolupat un model epidemiològic per predir la dinàmica de l'inòcul aeri de *P. amygdalinum*, i hem validat la seva integració en un sistema de suport a la presa de decisions (DSS; de l'anglès *Decision Support System*) per optimitzar així les estratègies d'aplicació de fungicides per al control de la malaltia (Capítol 3).

En relació a l'avaluació de l'eficàcia de productes fungicides, la necessitat d'un treball com el descrit en el Capítol 1 respon a la constant actualització i limitació dels productes fitosanitaris permesos per les autoritats reguladores, estatals i europees, així com de la necessitat de comptar amb noves substàncies actives per fer front a les malalties. A més de vetllar perquè els productes fitosanitaris siguin segurs per a la salut humana i el medi ambient, cal evitar l'ús repetitiu de determinats productes, el que podria promoure l'aparició de resistències en les poblacions del patogen (Brent i Hollomon, 2007; Yin *et al.*, 2023). Per tot això, és necessària una avaluació continua de la idoneïtat dels productes autoritzats, així com explorar l'eficàcia de nous productes comercialitzats, potser permesos pel control

d'altres malalties de l'ametller o fins i tot d'altres cultius, però que podrien ser candidats per al control de la taca ocre. Els resultats obtinguts en aquest estudi mostren una major eficàcia dels productes sistèmics avaluats en el control de la taca ocre, en comparació als productes de contacte. D'entre els fungicides sistèmics, el fluopiram, la trifloxistrobina, la combinació de fluopiram i trifloxistrobina i la combinació de piraclostrobina i boscalida, destacaren per obtenir una eficàcia global mitjana de fins al 90 %. En contrast, fungicides de contacte com el captan, el folpet i el producte de base cúprica (òxid de coure) mostraren les eficàcies més baixes.

Així doncs, dels tres productes fungicides actualment autoritzats pel control de la taca ocre a Espanya (MAPA, 2023b), tots ells sistèmics, hem confirmat l'alta eficàcia del producte compost de piraclostrobina i boscalida, comercialitzat com a Signum®. És per això, que aquest producte fou l'utilitzat per avaluar les estratègies d'aplicació en el Capítol 1 i en el Capítol 3. Els altres dos productes registrats són el difenoconazol i la combinació de difenoconazol i kresoxim-metil, però aquests no s'han avaluat en la present tesi doctoral. Cal esmentar que ambdós productes contenen difenoconazol, una substància activa que actualment està considerada com a candidata a la substitució segons el Reglament (CE) nº 1107/2009 del Parlament Europeu (European Commission, 2009b). Això significa que presenta certes propietats que comporten un major risc pel medi ambient i la salut, i que en els propers anys haurà de ser substituïda per una substància activa de risc més baix. Tanmateix, en aquest treball sí que s'han avaluat altres fungicides del mateix grup químic que el difenoconazol, els triazols (grup FRAC 3), com ara el fenbuconazol, el ciproconazol, el miclobutanil i el tebuconazol (FRAC, 2022). La seva eficàcia contra la taca ocre de l'ametller fou variable en funció del producte, però val a dir que tots ells han estat cancel·lats a la Unió Europea el 2021, a excepció del tebuconazol (European Commission, 2009b; 2023). L'ús d'aquest últim, que presentà una eficàcia moderada (50-75 %) contra la taca ocre, continua actualment autoritzat en el cultiu de l'ametller pel control de la moniliosi (causada per fongs del gènere *Monilinia*) (MAPA, 2023b).

Així doncs, es fa evident la necessitat d'incloure nous productes en el programa de control de la taca ocre de l'ametller. D'aquesta manera, es busca diversificar els mecanismes d'acció de les matèries actives i minimitzar així l'aparició de resistències en el patogen. Una possible alternativa per tenir en compte seria la incorporació de la dodina en estratègies de protecció amb alternança de productes. La dodina és un fungicida amb acció sistèmica local, actualment registrat a Espanya en el cultiu de l'ametller pel control de l'arrufat (*Taphrina deformans* (Berk.) Tul.) i inclòs al grup FRAC U12 (FRAC, 2022; MAPA, 2023b). Altres productes avaluats i tradicionalment recomanats a Espanya pel control de la taca ocre, com el tiram i el captan, ja no estan aprovats en la Unió Europea o són candidats a la substitució, respectivament (European Commission, 2009b; 2023). També és important recordar que, malgrat actualment no existeixen alternatives biològiques pel control de la taca ocre de

l'ametller, és previsible que en un futur aquestes estratègies guanyin importància per reduir la dependència dels productes fungicides convencionals. Aquests fungicides biològics (grup FRAC BM) poden ser d'origen vegetal o microbià, com és el cas dels microorganismes benèfics o els agents de control biològic, i tenen múltiples modes d'acció, actuant directament sobre el patògen o induint els mecanismes de defensa de la planta (FRAC, 2022; Beckerman *et al.*, 2023; Sarrocco, 2023).

Conèixer l'epidemiologia d'un patògen i els factors que influeixen en les diferents etapes del seu cicle biològic és fonamental per construir una estratègia de control precisa i efectiva (De Wolf i Isard, 2007; Madden *et al.*, 2007; Nutter, 2007). En el cas de *P. amygdalinum*, la seva condició hemibiòtrofa en dificulta el creixement en medis de cultiu artificials, fet que comporta que, avui en dia, l'única fase del seu cicle biològic que s'ha pogut desenvolupar i estudiar en condicions controlades de laboratori és la germinació de les ascòspores i la formació dels apressoris (Habibi i Banihashemi, 2015; Zúñiga *et al.*, 2020). Malgrat s'ha informat de la realització amb èxit d'inoculacions artificials controlades mitjançant suspensions d'ascòspores, no s'han definit les condicions ni el protocol per a la seva reproducció (Habibi i Banihashemi, 2016). Tenint en compte això, els estudis epidemiològics sobre *P. amygdalinum* i la taca ocre de l'ametller es basen principalment en dades empíriques obtingudes al camp, en condicions reals de cultiu. Com s'ha explicat en la introducció general d'aquesta tesi, l'enfocament empíric pot ser útil per explorar i identificar les relacions entre les condicions meteorològiques observades i certes fases del cicle biològic del patògen. No obstant, no proporciona una explicació sobre els mecanismes biològics subjacents al procés, i les relacions observades són difícilment extrapolables a contextos geogràfics o agrícoles diversos, fet que dificulta fer prediccions fora de l'abast de les dades recollides i, per extensió, de la zona on s'ha realitzat l'estudi (De Wolf i Isard, 2007; Rossi *et al.*, 2010; Caffi i Rossi, 2018; Rossi *et al.*, 2019). Malgrat aquestes limitacions, els models empírics s'usen habitualment per descriure matemàticament les relacions entre processos biològics complexos i les variables biòtiques o abiòtiques potencialment influents. Quedarà, com exercici posterior, calibrar i validar aquests models epidemiològics en diferents realitats geogràfiques per avaluar el seu ajust.

A Espanya, el desenvolupament i la maduració de l'inòcul de *P. amygdalinum* han estat estudiats per Zúñiga *et al.* (2020). No obstant, és convenient matissar que aquest estudi fa referència a l'inòcul potencial, és a dir, a les ascòspores presents en la fullaraca i que potencialment podrien ser alliberades i infectar les fulles noves de l'ametller. Fins ara, la dinàmica de l'inòcul aerovagant de *P. amygdalinum* tan sols s'havia estudiat a l'Iran i al Líban, sempre mitjançant captures setmanals d'espores i recomptes en observacions microscòpiques (Banihashemi, 1990; Saad i Masannat, 1997). En contrast, en aquesta tesi doctoral aprofundim en el coneixement de la dinàmica aèria de l'inòcul de *P. amygdalinum* en condicions reals de cultiu, en dues plantacions d'ametller de la zona de Lleida. Per assolir

aquest objectiu, hem implementat per primera vegada en un estudi de camp el protocol de qPCR i els encebadors específics desenvolupats per Zúñiga *et al.* (2018) per a la detecció i quantificació de *P. amygdalinum* en mostres provinents de captadors volumètrics d'aire. Gràcies a aquesta metodologia, hem estat capaços de quantificar i monitorar la presència d'inòcul aeri de *P. amygdalinum* durant tres temporades i amb una freqüència diària, amb una major rapidesa, especificitat i sensibilitat que amb la quantificació microscòpica tradicionalment utilitzada per quantificar aquest patogen (Banihashemi, 1990; Saad i Masannat, 1997; Zúñiga *et al.*, 2018; Van der Heyden *et al.*, 2021). Els resultats obtinguts en el Capítol 2 mostren que, en la zona d'estudi, l'inòcul aeri de *P. amygdalinum* es pot trobar present des de febrer fins a mitjans de setembre, tot i que la major proporció d'aquest s'allibera entre els mesos d'abril i juny. Això representa un període de detecció més ampli que el descrit en estudis anteriors (Banihashemi, 1990; Saad i Masannat, 1997), que es podria explicar per les condicions geogràfiques diferents però també per la major sensibilitat de la metodologia utilitzada en el nostre cas. Hem observat una gran variabilitat en la quantitat acumulada d'inòcul anual segons l'any d'estudi i la localitat, fet que ens recorda la necessitat d'aprofundir en alguns aspectes epidemiològics pendents de resoldre en estudis futurs, com ara la relació entre la quantitat d'inòcul i el nivell de malaltia en l'any anterior, o la distància potencial de dispersió de l'inòcul i els factors que hi influeixen. Hem constatat, també, que la presència d'ascòspores aerovagants es correlaciona positivament amb variables meteorològiques de la mateixa setmana, concretament amb temperatures mitjanes d'entre 10 i 20 °C, i amb variables relacionades amb la humitat i la precipitació. En coherència amb això, hem observat correlacions negatives amb algunes variables tèrmiques com la temperatura màxima, el dèficit de pressió de vapor (VPD) i les temperatures mitjanes superiors a 20 °C.

En el Capítol 3, i a partir de les dades obtingudes i analitzades en el capítol anterior, hem utilitzat un model de regressió beta per descriure la dinàmica estacional de l'inòcul aeri de *P. amygdalinum* en funció de variables meteorològiques de tipus grau-dia (Ferrari i Cribari-Neto, 2004). Aquest enfocament segueix exemples previs en que diversos processos biològics associats a patologies vegetals, com l'alliberament d'ascòspores o el progrés de la malaltia, s'han descrit com a dependents de l'acumulació de temps tèrmic (Lovell *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2009; Marimon *et al.*, 2020; Martínez-Minaya *et al.*, 2021). El millor model resultant, seleccionat d'entre un total de 16 models avaluats, ens relaciona la proporció acumulada d'ascòspores amb les variables fixes ADD (graus-dia acumulats) i ADDwet (ADD considerant el dèficit de pressió de vapor i la precipitació), i alhora inclou un factor aleatori associat a l'any i a la localitat. D'aquesta manera, es posa de manifest un cop més el rol determinant de les variables tèrmiques i hídriques en la presència d'ascòspores aerovagants de *P. amygdalinum*. Aquests resultats van en consonància amb nombrosos estudis sobre altres ascomicets patògens, en els que la temperatura i la humitat han estat considerades

determinants en el desenvolupament de les ascòspores i el seu alliberament (Rossi *et al.*, 2007; Trail, 2007; Rossi *et al.*, 2009; Vicent *et al.*, 2011; Martínez-Minaya *et al.*, 2021). Segons el nostre coneixement, aquest treball representa el primer model epidemiològic desenvolupat per predir la dinàmica de l'inòcul aeri de *P. amygdalinum*.

Pel que fa al progrés de la malaltia, estudis previs havien proporcionat informació sobre el moment d'aparició dels primers símptomes de taca ocre o sobre la incidència de la malaltia en un moment donat (Banhashemi, 1990; Saad i Masannat, 1997). No obstant, el progrés de la taca ocre durant la temporada tant sols havia estat monitorat per Miarnau *et al.* (2021), en un estudi on es feu el seguiment quinzenal de la incidència de la taca ocre en quatre cultivars amb diferents graus de susceptibilitat a la malaltia. En el Capítol 2 d'aquesta tesi, en canvi, hem realitzat un seguiment setmanal dels símptomes, millorant així la freqüència del monitoratge. Aquest enfocament ha permès explorar l'ajust de les dades en diferents corbes de progrés de la malaltia. D'entre aquestes equacions, la monomolecular s'utilitza habitualment per descriure el progrés de les malalties monocíclics, mentre les equacions logística i Gompertz, de forma sigmoïdal, s'adeqüen millor al progrés de les malalties policíclics (Pfender, 1982; Madden *et al.*, 2007). En el cas de la taca ocre de l'ametller, malgrat es tracta d'una malaltia monocíclica, hem observat que les tres equacions avaluades són útils per descriure el desenvolupament de la seva incidència, amb una bondat d'ajust a les dades alta i similar entre les diferents equacions. Cal assenyalar que la naturalesa d'un sistema patològic no es pot inferir per l'ajust més o menys apropiat a un model concret (Pfender, 1982; Xu, 2006). De manera similar al nostre cas, les equacions logística i Gompertz han estat utilitzades anteriorment per descriure el progrés d'altres malalties monocíclics (Aghajani *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2021; Guamani-Quimis *et al.*, 2022). Per últim, també hem observat que el progrés setmanal de la malaltia, tant en termes d'incidència com de severitat, es correlaciona positivament amb les temperatures mitjanes superiors a 20 °C.

Tornant a l'optimització del control de la taca ocre, l'Annex III de la Directiva Europea 2009/128/CE defineix els principis generals de la gestió integrada de plagues, entre els quals es limita l'ús de pesticides als nivells estrictament necessaris, ja sigui mitjançant la reducció de la dosi o de la freqüència d'aplicació (European Commission, 2009a). Més recentment, la Comissió Europea ha presentat l'estratègia 'de la granja a la taula' en el marc del Pacte Verd Europeu, on es fixa l'objectiu de reduir en un 50 % l'ús de pesticides químics d'aquí a l'any 2030 (European Commission, 2020). Així doncs, per contribuir a l'assoliment d'aquests objectius, en el Capítol 1 i en el Capítol 3 hem avaluat diferents estratègies per programar les aplicacions de fungicides contra la taca ocre, amb el propòsit de reduir la freqüència d'aplicació i, conseqüentment, la quantitat total de fungicides aplicats durant la campanya del cultiu sense comprometre'n la seva protecció.

Els resultats del Capítol 1 demostren que programar les aplicacions fungicides seguint un criteri meteorològic (15 dies després de precipitacions superiors a 15 mm, amb temperatures mínimes d'entre 10 i 15 °C) proporciona uns nivells de protecció contra la taca ocre equiparables a les estratègies tradicionals –basades en una freqüència d'aplicació fixa–, tot i que amb un menor nombre d'aplicacions. Els criteris meteorològics emprats com a llindar d'acció s'establiren en base a estudis anteriors sobre l'epidemiologia de *P. amygdalinum*, els quals ja demostraven la importància de les variables tèrmiques i hídriques en la dinàmica de l'inòcul primari i la incidència estacional de taca ocre (Banihashemi, 1990; Zúñiga *et al.*, 2020; Miarnau *et al.*, 2021). Aquest treball representa un primer pas en el desenvolupament d'un programa optimitzat de tractaments fungicides, al mateix temps que es posa de manifest que és possible disminuir la freqüència d'aplicació tenint en compte l'epidemiologia del patogen.

El Capítol 3 va més enllà, i integra el model epidemiològic desenvolupat per predir la dinàmica de l'inòcul aeri de *P. amygdalinum* en un DSS per a la programació de les aplicacions fungicides pel control de la taca ocre. Mitjançant aquest DSS, podem establir uns llindars d'actuació per determinar l'inici i el final del període de protecció en base a les prediccions del model, el que pot ajudar a millorar les estratègies avaluades en el Capítol 1, totes elles amb inici en la caiguda de pètals. Addicionalment, en l'avaluació comercial del DSS considerarem dues variants per establir la freqüència entre aplicacions: bé seguint una cadència fixa de 21 dies, o bé mitjançant un criteri meteorològic (adaptat a partir del criteri usat en el Capítol 1). Els resultats mostren com l'ús del model permet reduir notablement el nombre d'aplicacions fungicides amb un impacte baix en la incidència de la malaltia, ja que permet ajustar els programes de protecció al període en el que el risc d'infecció és més alt. Programar els tractaments fent ús del model i amb una cadència de 21 dies, resultà en una reducció del 46 % en el nombre d'aplicacions fungicides i només un augment del 2,6 % en la incidència, en comparació a la estratègia tradicional. En canvi, l'ús del model en combinació amb el criteri meteorològic (per establir la freqüència entre aplicacions), permeté reduir fins a un 68 % el nombre d'aplicacions fungicides, malgrat això suposà un augment del 16 % en la incidència, en comparació també a la estratègia tradicional. Un aspecte important de resoldre i quantificar, en un futur, és l'impacte de nivells baixos de taca ocre en el rendiment del cultiu de l'ametller, per determinar quin és el llindar de malaltia que es pot assumir sense comprometre la producció.

És important recordar que, tot i que el monitoratge i la modelització de l'inòcul aeri de patògens vegetals està guanyant interès com a eina per proporcionar als productors una alerta precoç del risc d'aparició de la malaltia (Gent *et al.*, 2013; Martínez-Minaya *et al.*, 2021; Van der Heyden *et al.*, 2021; Mahaffee *et al.*, 2023), la presència d'ascòspores en l'ambient no implica *per se* la infecció. Això es deu a que les ascòspores poden fracassar en el posterior contacte amb l'hoste, en la germinació, o en la penetració en el teixit vegetal.



Així mateix, la fenologia de l'hoste és un factor important a considerar. En el cas de la taca ocre, per exemple, les ascòspores alliberades abans de l'aparició de les noves fulles de l'ametller no donaran lloc a infeccions. També podem observar que, malgrat en el Capítol 2 de la present tesi doctoral descrivim un període de detecció d'inòcul aeri que s'estén fins al setembre, el període d'infecció descrit prèviament a Catalunya es limita als mesos primaverals (Zúñiga *et al.*, 2020). El fet que la germinació de les ascòspores i la formació dels apressoris decaiguin a temperatures superiors a 20 °C (Habibi i Banihashemi, 2015), podria ser una explicació al fet que les ascòspores alliberades als mesos d'estiu no resultin en infeccions efectives. Així doncs, completar i integrar la informació epidemiològica sobre les diferents fases del cicle biològic del patogen relacionades amb la infecció de l'hoste i la incubació dels símptomes, permetria acotar millor el risc real d'infecció i de desenvolupament de la malaltia (Rossi *et al.*, 2010; González-Domínguez *et al.*, 2023). En el cas de *P. amygdalinum*, com hem explicat anteriorment, tenim dos grans reptes metodològics l'abordatge dels quals podria proporcionar informació molt valuosa. D'una banda, la possibilitat de cultivar el patogen en medis de cultiu artificials afavoriria l'estudi en condicions controlades de diferents fases del seu cicle. Per altra banda, el desenvolupament d'inoculacions artificials controlades del patogen en l'hoste obriria la porta a la realització d'assaigs relacionats amb la protecció del cultiu: la selecció de productes de protecció, l'avaluació de la susceptibilitat de les varietats i la millora del coneixement de la biologia i epidemiologia de la malaltia, entre d'altres.

En conjunt, la present tesi doctoral contribueix al coneixement d'aspectes clau de l'epidemiologia de *P. amygdalinum* i representa un pas important en l'optimització del control de la taca ocre de l'ametller mitjançant fungicides. Entre els resultats obtinguts, hem desenvolupat i validat estratègies de control més específiques i sostenibles, alhora que hem contribuït a l'objectiu del Pacte Verd Europeu de reduir l'ús de pesticides en un 50 % per a l'any 2030 (European Commission, 2020). Tanmateix, en el marc de la gestió integrada de les malalties, és important recordar que el control químic no és l'única mesura de protecció disponible. És necessari explorar noves alternatives, com la del control biològic, així com optimitzar les ja conegudes pràctiques agrícoles per reduir la quantitat d'inòcul i tenir en compte el grau de susceptibilitat a la malaltia en el moment de seleccionar les cultivars per establir noves plantacions. L'adequada implementació de les mesures comentades fins ara, juntament amb una comprensió més profunda de l'epidemiologia del patogen, permetrà desenvolupar una estratègia integrada, específica i respectuosa amb el medi ambient i la salut humana, que ajudi a mitigar l'impacte de la taca ocre en el cultiu de l'ametller i en garanteixi la seva viabilitat.

## Referències

- Aghajani M.A., Safaie N., Alizadeh A. (2010) Disease progress curves of Sclerotinia Stem Rot of canola epidemics in Golestan Province, Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, **12**, 471-478.
- Banihashemi Z. (1990) Biology and control of *Polystigma ochraceum*, the cause of almond red leaf blotch. *Plant Pathology*, **39**, 309-315.
- Beckerman J., Palmer C., Tedford E., Ypema H. (2023) Fifty years of fungicide development, deployment, and future use. *Phytopathology*, **113**, 694-706.
- Brent K.J., Hollomon D.W. (2007) *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?*, Brussels: Fungicide Resistance Action Committee.
- Budzinski H., Couderchet M. (2018) Environmental and human health issues related to pesticides: from usage and environmental fate to impact. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 14277-14279.
- Caffi T., Rossi V. (2018) Fungicide models are key components of multiple modelling approaches for decision-making in crop protection. *Phytopathologia Mediterranea*, **57**, 153-169.
- De Wolf E.D., Isard S.A. (2007) Disease cycle approach to plant disease prediction. *Annual Review of Phytopathology*, **45**, 203-220.
- European Commission (2009a) Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *En*: pp. 71-86, Official Journal of the European Union.
- European Commission (2009b) Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *En*: pp. 1-50, Official Journal of the European Union.
- European Commission (2020) Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system. *En*: COM(2020) 381 final.
- European Commission (2023) *EU Pesticides Database v3.1* [Online]. Disponible: <https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database> [Consulta: 01/06/2023].
- Ferrari S.L.P., Cribari-Neto F. (2004) Beta regression for modelling rates and proportions. *Journal of Applied Statistics*, **31**, 799-815.
- FRAC (2022) *FRAC Code List ©2022: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels)* [Online]. Disponible: <https://www.frac.info/knowledge-database/knowledge-database> [Consulta: 16/01/2023].
- Gent D.H., Mahaffee W.F., McRoberts N., Pfender W.F. (2013) The use and role of predictive systems in disease management. *Annual Review of Phytopathology*, **51**, 267-289.

- González-Domínguez E., Caffi T., Rossi V., Salotti I., Fedele G. (2023) Plant disease models and forecasting: changes in principles and applications over the last 50 years. *Phytopathology*, **113**, 678-693.
- Guamani-Quimis L.A., Solís-Bowen A.L., Portalanza D., Garcés-Fiallos F.R. (2022) Can mathematical models describe Spear rot progress in oil palm trees? A five-year Black weevil-disease assessment from Ecuador. *Agriculture*, **12**, 257.
- Habibi A., Banihashemi Z. (2015) Ascospore germination and appressorium formation in vitro of *Polystigma amygdalinum* and its survival period. *Iranian Journal of Plant Pathology*, **51**, 461-469.
- Habibi A., Banihashemi Z. (2016) Mating system and role of pycnidiospores in biology of *Polystigma amygdalinum*, the causal agent of almond red leaf blotch. *Phytopathologia Mediterranea*, **55**, 98-108.
- Liu X., Woodward J.E., Kelly B., Lewis K.L., Byrd S.A., Chen Y. (2021) Effects of production practices on temporal disease progress of Verticillium wilt of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in the Texas High Plains, USA. *Crop Protection*, **140**, 105429.
- Lovell D.J., Powers S.J., Welham S.J., Parker S.R. (2004) A perspective on the measurement of time in plant disease epidemiology. *Plant Pathology*, **53**, 705-712.
- Madden L.V., Hughes G., van den Bosch F. (2007) *The study of plant disease epidemics*, St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society.
- Mahaffee W.F., Margairaz F., Ulmer L., Bailey B.N., Stoll R. (2023) Catching spores: linking epidemiology, pathogen biology, and physics to ground-based airborne inoculum monitoring. *Plant Disease*, **107**, 13-33.
- MAPA (2023a) *Frutos secos: Análisis de la realidad productiva 2021* [Online]. Disponible: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/frutas-y-hortalizas/Analisis%20realidad%20productiva%20frutos%20de%20cascara.aspx> [Consulta: 13/06/2023].
- MAPA (2023b) *Registro de Productos Fitosanitarios*. [Online]. Disponible: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/fitos.asp> [Consulta: 01/05/2023].
- Marimon N., Eduardo I., Martínez-Minaya J., Vicent A., Luque J. (2020) A decision support system based on degree-days to initiate fungicide spray programs for peach powdery mildew in Catalonia, Spain. *Plant Disease*, **104**, 2418-2425.
- Martínez-Minaya J., Conesa D., López-Quílez A., Mira J.L., Vicent A. (2021) Modeling inoculum availability of *Plurivorosphaerella nawae* in persimmon leaf litter with Bayesian beta regression. *Phytopathology*, **111**, 1184-1192.
- Miarnau X., Zazurca L., Torguet L., Zúñiga E., Batlle I., Alegre S., Luque J. (2021) Cultivar susceptibility and environmental parameters affecting symptom expression of red leaf blotch of almond in Spain. *Plant Disease*, **105**, 940-947.
- Nutter F.F. (2007) The role of plant disease epidemiology in developing successful integrated disease management programs. *En: General Concepts in Integrated Pest and Disease Management*, pp. 45-80. Eds Ciancio A. & Mukerji K.G. Dordrecht: Springer.

- Ollero-Lara A., Agustí-Brisach C., Lovera M., Roca L.F., Arquero O., Trapero A. (2019) Field susceptibility of almond cultivars to the four most common aerial fungal diseases in southern Spain. *Crop Protection*, **121**, 18-27.
- Pfender W.F. (1982) Monocyclic and polycyclic root diseases. Distinguishing between the nature of the disease cycle and the shape of the disease progress curve. *Phytopathology*, **72**, 31-32.
- Pons-Solé G., Miarnau X., Torguet L., Lázaro E., Vicent A., Luque J. (2023) Airborne inoculum dynamics of *Polystigma amygdalinum* and progression of almond red leaf blotch disease in Catalonia, NE Spain. *Annals of Applied Biology*, **183**, 33-42.
- Rossi V., Bolognesi M., Giosuè S. (2007) Seasonal dynamics of *Taphrina deformans* inoculum in peach orchards. *Phytopathology*, **97**, 352-358.
- Rossi V., Giosuè S., Caffi T. (2010) Modelling plant diseases for decision making in crop protection. *En: Precision Crop Protection - The Challenge and Use of Heterogeneity*, pp. 241-258. Eds Gerhards R., Oerke E., Menz G. & Sikora R. Dordrecht: Springer.
- Rossi V., Salinari F., Patteri E., Giosuè S., Bugiani R. (2009) Predicting the dynamics of ascospore maturation of *Venturia pirina* based on environmental factors. *Phytopathology*, **99**, 453-461.
- Rossi V., Sperandio G., Caffi T., Simonetto A., Gilioli G. (2019) Critical success factors for the adoption of decision tools in IPM. *Agronomy*, **9**, 710.
- Saad A.T., Masannat K. (1997) Economic importance and cycle of *Polystigma ochraceum*, causing red leaf blotch disease of almond, in Lebanon. *EPPO Bulletin*, **27**, 481-485.
- Sarrocchio S. (2023) Biological disease control by beneficial (micro)organisms: selected breakthroughs in the past 50 years. *Phytopathology*, **113**, 732-740.
- Torguet L., Zazurca L., Martínez G., Pons-Solé G., Luque J., Miarnau X. (2022) Evaluation of fungicides and application strategies for the management of the red leaf blotch disease of almond. *Horticulturae*, **8**, 501.
- Trail F. (2007) Fungal cannons: explosive spore discharge in the Ascomycota. *FEMS Microbiology Letters*, **276**, 12-18.
- Van der Heyden H., Dutilleul P., Charron J.B., Bilodeau G.J., Carisse O. (2021) Monitoring airborne inoculum for improved plant disease management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **41**, 40.
- Vicent A., Bassimba D.D.M., Intrigliolo D.S. (2011) Effects of temperature, water regime and irrigation system on the release of ascospores of *Mycosphaerella nawae*, causal agent of circular leaf spot of persimmon. *Plant Pathology*, **60**, 890-898.
- Xu X. (2006) Modelling and interpreting disease progress in time. *En: The Epidemiology of Plant Diseases*, pp. 215-238. Eds Cooke B., Jones D., Kaye B. Dordrecht: Springer.
- Yin Y., Miao J., Shao W., Liu X., Zhao Y., Ma Z. (2023) Fungicide resistance: progress in understanding mechanism, monitoring, and management. *Phytopathology*, **113**, 707-718.

- Zubrod J.P., Bundschuh M., Arts G., Bruhl C.A., Imfeld G., Knabel A., Payraudeau S., Rasmussen J.J., Rohr J., Scharmüller A., Smalling K., Stehle S., Schulz R., Schäfer R.B. (2019) Fungicides: an overlooked pesticide class? *Environmental Science & Technology*, **53**, 3347-3365.
- Zúñiga E., León M., Berbegal M., Armengol J., Luque J. (2018) A qPCR-based method for detection and quantification of *Polystigma amygdalinum*, the cause of red leaf blotch of almond. *Phytopathologia Mediterranea*, **57**, 257-268.
- Zúñiga E., Romero J., Ollero-Lara A., Lovera M., Arquero O., Miarnau X., Torguet L., Trapero A., Luque J. (2020) Inoculum and infection dynamics of *Polystigma amygdalinum* in almond orchards in Spain. *Plant Disease*, **104**, 1239-1246.



## Conclusions

---





## Conclusions

### Versió en català

- 1 Els fungicides sistèmics avaluats, incloent el fluopiram, la trifloxistrobina, i les combinacions de fluopiram + trifloxistrobina i piraclostrobina + boscalida, obtingueren millors resultats en el control de la taca ocre de l'ametller que els productes de contacte, amb una eficàcia global mitjana dels primers de fins al 90 %.
- 2 La incorporació d'un criteri meteorològic per programar les aplicacions fungicides, basat en l'epidemiologia de *Polystigma amygdalinum*, resultà en una eficàcia en el control de la taca ocre equiparable a l'obtinguda en les estratègies tradicionals basades en una freqüència d'aplicació fixa. A més, això permeté reduir considerablement el nombre total d'aplicacions durant la campanya del cultiu, fet que és rellevant tenint en compte les implicacions econòmiques i ambientals de l'ús excessiu de fungicides.
- 3 La tècnica de la PCR quantitativa s'ha usat satisfactòriament per la detecció i la quantificació d'ascòspores de *Polystigma amygdalinum* en mostres provinents de captadors volumètrics d'aire.
- 4 El monitoratge de l'inòcul aeri de *Polystigma amygdalinum* mitjançant PCR quantitativa indicà que el període de detecció d'ascòspores aerovagants –de febrer a setembre– és més ampli que el determinat per estudis anteriors. Tot i així, la major proporció d'ascòspores es detectà entre els mesos d'abril i juny.
- 5 En les condicions del cultiu de l'ametller en la zona de Lleida, la presència d'ascòspores aerovagants de *Polystigma amygdalinum* es correlacionà positivament i de forma significativa amb temperatures mitjanes suaus, d'entre 10 i 20 °C, així com amb variables relacionades amb la humitat i la precipitació.
- 6 En les condicions del cultiu de l'ametller en la zona de Lleida, l'avanç setmanal de la taca ocre de l'ametller, tant en termes d'incidència com de severitat, es correlacionà positivament i de forma significativa amb temperatures càlides, superiors als 20 °C.
- 7 Les equacions Gompertz, monomolecular i logística s'han usat satisfactòriament per descriure el progrés de la incidència de la taca ocre en funció del temps i a partir de l'aparició dels primers símptomes.

- 8 La dinàmica anual de l'inòcul aeri de *Polystigma amygdalinum* es pot descriure amb un model de regressió beta, que relaciona la proporció acumulada d'ascòspores amb les variables fixes *ADD* (graus-dia acumulats) i *ADDwet* (*ADD* considerant el dèficit de pressió de vapor i la precipitació), i alhora inclou un factor aleatori associat a l'any i la localitat.
- 9 El model epidemiològic desenvolupat en la present tesi doctoral s'ha integrat en un sistema de suport a la presa de decisions per optimitzar la programació dels tractaments fungicides contra la taca ocre de l'ametller, el que permeté establir uns llistats d'actuació al 10 % i al 65 % d'ascòspores predites per iniciar i finalitzar el període de protecció, respectivament.
- 10 L'ús del model epidemiològic, en combinació o no amb un criteri meteorològic per establir la freqüència entre tractaments, permeté reduir el número total d'aplicacions fungicides durant la campanya del cultiu en un 68 % i un 46 %, respectivament, comparat amb l'estratègia tradicional. Això es relacionà amb un augment en la incidència de la malaltia d'entre el 16 % i el 2,6 %, respectivament.

## English version

- 1 The evaluated systemic fungicides, including fluopyram, trifloxystrobin, and the combinations of fluopyram + trifloxystrobin and pyraclostrobin + boscalid, performed better than contact products in the control of almond red leaf blotch, with an average overall efficacy of up to 90% for the former.
- 2 The inclusion of a meteorological criterion for scheduling fungicide applications, based on the epidemiology of *Polystigma amygdalinum*, resulted in a control efficacy against almond red leaf blotch similar to that achieved with the traditional strategies using fixed application frequencies. Additionally, it notably reduced the total number of fungicide applications during the crop season, which is relevant considering the economic and environmental implications of an excessive fungicide use.
- 3 The quantitative PCR technique has been successfully used for the detection and quantification of *Polystigma amygdalinum* ascospores in samples obtained from volumetric air samplers.
- 4 Monitoring the airborne inoculum of *Polystigma amygdalinum* using quantitative PCR revealed a period of airborne ascospore detection –from February to September– longer than reported in previous studies. However, the highest proportion of airborne ascospores was detected between April and June.
- 5 Under the almond crop conditions in the Lleida region (NE Spain), the presence of airborne ascospores of *Polystigma amygdalinum* showed a significant positive correlation with mild average temperatures, ranging between 10 and 20 °C, as well as with variables related to humidity and precipitation.
- 6 Under the almond crop conditions in the Lleida region (NE Spain), the weekly progression of almond red leaf blotch, both in terms of incidence and severity, showed a significant positive correlation with warm temperatures above 20 °C.
- 7 Gompertz, monomolecular, and logistic equations were successfully used to describe the progression of almond red leaf blotch incidence over time from the onset of the first symptoms.
- 8 The annual dynamics of the airborne inoculum of *Polystigma amygdalinum* can be described using a beta regression model that relates the cumulative proportion of ascospores to the fixed variables ADD (accumulated degree-days) and ADDwet (ADD considering vapour pressure deficit and precipitation), also including a random factor accounting for the year and location variability.

- 9 The epidemiological model developed in the present PhD thesis has been integrated into a decision support system to optimize the scheduling of fungicide applications against almond red leaf blotch. This has enabled the establishment of action thresholds at 10% and 65% of predicted ascospores to determine the start and the end of the protection period, respectively.
  
- 10 The use of the epidemiological model, either alone or in combination with a meteorological criterion to determine the frequency between treatments, led to a reduction in the total number of fungicide applications during the crop season by 46% and 68%, respectively, and compared to the traditional strategy. This reduction was associated with an increase in disease incidence ranging from 2.6% to 16%, respectively.

## **Annex**

---



Contribucions científiques i divulgatives derivades d'aquesta tesi doctoral:

### ► Articles científics

**Pons-Solé G.**, Torguet L., Marimon N., Miarnau X., Lázaro E., Vicent A., Luque J. (2022) Modeling the airborne inoculum of *Polystigma amygdalinum* to optimize fungicide programs against almond red leaf blotch. Enviat a *Plant Disease*.

**Pons-Solé G.**, Miarnau X., Torguet L., Lázaro E., Vicent A., Luque J. (2023) Airborne inoculum dynamics of *Polystigma amygdalinum* and progression of almond red leaf blotch disease in Catalonia, NE Spain. *Annals of Applied Biology*, **183**, 33-42.

Torguet L., Zazurca L., Martínez G., **Pons-Solé G.**, Luque J., Miarnau X. (2022) Evaluation of fungicides and application strategies for the management of the red leaf blotch disease of almond. *Horticulturae*, **8**, 501.

### ► Articles tècnics i de divulgació

**Pons-Solé G.**, Miarnau X., Torguet L., Zazurca L., Zúñiga E., Luque J. (2021) La mancha ocre del almendro: ¿qué sabemos de esta enfermedad y su control? *Tierras - Agricultura*, **298**, 74-82.

**Pons-Solé G.**, Cabrefiga J., Sabaté J., Luque J. (2023) Les principals malalties de l'ametller a Catalunya. *Quaderns agraris*, en premsa.

Torguet L., Zazurca L., Martínez G., **Pons-Solé G.**, Luque J., Miarnau X. (2022) Estrategias de control de la mancha ocre del almendro. *Vida Rural*, **525**, 26-32.

### ► Contribucions a congressos i jornades

**Pons-Solé G.**, Luque J.: Aplicacions de la detecció molecular de *Polystigma amygdalinum*, agent causal de la taca ocre de l'ametller, en la millora del seu control en camp (Comunicació oral). VI Jornada Científica del Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia (UAB), Bellaterra, Espanya, 15 de juny de 2021.

**Pons-Solé G.**, Torguet L., Miarnau X., Luque J.: La taca ocre de l'ametller: Què en sabem? (Comunicació Oral). Setmana Fructícola - IRTA, Mollerussa, 20-22 d'octubre de 2021.

**Pons-Solé G.**, Lázaro E., Vicent A., Luque J.: Modelling the airborne inoculum of *Polystigma amygdalinum*, causal agent of the red leaf blotch of almond in Catalonia, NE Spain (Comunicació oral). 16th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Limassol, Xipre, 4-8 d'abril de 2022.

**Pons-Solé G.**, Lázaro E., Torguet L., Miarnau X., Vicent A., Luque J.: Modelización del inóculo aéreo de *Polystigma amygdalinum* para optimizar el control de la mancha ocre del almendro (Comunicació oral). XX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, València, Espanya, 24-26 d'octubre de 2022.

**Pons-Solé G.**, Marimon N., Zazurca L., Castellet E., Miarnau X., Luque J., Torguet L.: Prácticas agrícolas para la reducción del inóculo de *Polystigma amygdalinum*, causante de la mancha ocre del almendro (Pòster). XX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, València, Espanya, 24-26 d'octubre de 2022.

**Pons-Solé G.**, Luque J., Martos S.: Regulación hormonal y genética de la tolerancia varietal a la mancha ocre del almendro (Pòster). XX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, València, Espanya, 24-26 d'octubre de 2022.

Torguet L., Zazurca L., Martínez G., **Pons-Solé G.**, Luque J., Miarnau X.: Fungicidas y estrategias para el control de la mancha ocre (*Polystigma amygdalinum*) del almendro (Pòster). XX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, València, Espanya, 24-26 d'octubre de 2022.

### ► Disponibilitat de dades

Les dades que recolzen els resultats dels Capítols 2 i 3 d'aquesta tesi doctoral estan disponibles en accés obert:

Luque J., **Pons-Solé G.**, Miarnau X., Torguet L., Lázaro E., Vicent A. (2023) Modelling airborne inoculum dynamics and disease progression of the red leaf blotch of almond in Catalonia, NE Spain. CORA (Catalan Open Research Area - Repositori de Dades de Recerca) V2. <https://doi.org/10.34810/data237>.









Epidemiologia i optimització del control de *Polystigma amygdalinum*,  
agent causal de la taca ocre de l'ametller

Tesi Doctoral  
Gemma Pons Solé  
2023