



**EPS**

Escola Politècnica

**UdG** Superior

## Projecte/Treball Fi de Carrera

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

**Títol:** Dinàmica d' esporulació del fong *Stemphylium vesicarium* en perera i determinació de la viabilitat dels conidis en funció de paràmetres ambientals

**Document:** Memòria

**Alumne:** IGNASI CASTRO SANTOS

**Director/Tutor:** ISIDRE LLORENTE CABRATOSA

**Departament:** Eng. Química, Agrària i Tec. Agroalimentària

**Àrea:** Producció Vegetal

**Convocatòria** (mes/any): Febrer/2007

# ÍNDEX

<b>RESUM</b> .....	3
<b>AGRAÏMENTS</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	7
1- L'Estemfiliosi en perera.....	7
2- La malaltia i la seva simptomatologia.....	8
3- Resistència de la malaltia de diferents varietats de pereres.....	9
4- Agent causant de la malaltia.....	9
5- Característiques i biologia del fong.....	9
6- Classificació taxonòmica del fong.....	11
7- Cicle de la malaltia.....	12
7.1- Multiplicació del patogen.....	12
7.2- Conservació de l'inòcul.....	12
7.3- Disseminació.....	12
7.4- Germinació i Penetració.....	13
7.5- Infecció.....	13
8- Cicle biològic del patogen.....	14
9- Efecte dels factors climàtics en l'inòcul primari.....	15
10- Efecte dels factors climàtics en l'inòcul secundari.....	16
11- Mètodes de control de l'estemfiliosi.....	16
11.1- Control de la fase sexual ( <i>P.allii</i> ).....	17
11.2- Control de la fase asexual ( <i>S.vesicarium</i> ).....	18
<b>OBJECTIUS</b> .....	21
<b>MATERIAL I MÈTODES</b> .....	22
1- Assaig Finestres en brots.....	22
1.1- Objectiu.....	22
1.2- Característiques.....	22
1.3- Avaluació del nivell de la malaltia.....	24
2- Assaig Finestres en plantes.....	25
2.1- Objectiu.....	25

2.2- Característiques.....	25
2.3- Avaluació del nivell de la malaltia.....	27
3- Assaig de viabilitat de l'inòcul.....	27
3.1- Viabilitat sobre planta en condicions d'hivernacle.....	27
1- Objectiu.....	27
2- Característiques.....	27
3- Determinació dels nivells de la malaltia.....	31
3.2- Viabilitat sota condicions controlades.....	33
1- Objectiu.....	33
2- Característiques.....	33
3- Determinació de la viabilitat.....	36
<b>RESULTATS.....</b>	<b>38</b>
1- Assaig Finestres en brots.....	38
2- Assaig Finestres en plantes.....	40
3- Assaig de viabilitat de l'inòcul.....	42
3.1- Viabilitat sobre planta en condicions d'hivernacle.....	42
3.2- Viabilitat sota condicions controlades.....	44
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>50</b>
<b>ANNEXOS.....</b>	<b>55</b>

# RESUM

L'estemfiliosi és una de les malalties d'origen fúngic amb més importància econòmica en el cultiu de la perera, en diferents zones productives d'Europa. Aquesta malaltia pot afectar una gran part del cultiu, arribant a ser la causant de fins el 90% de les pèrdues de la producció.

Estudis previs han relacionat l'esperulació de *S. vesicarium* en relació a paràmetres ambientals com la humitat relativa, la temperatura i la precipitació. Tot i això no s'ha determinat la viabilitat d'aquests conidis emesos al llarg del temps.

L'objectiu d'aquest treball ha estat per una banda determinar la dinàmica d'esperulació i emissió de conidis de *S. vesicarium* en finques comercials de perera i per l'altra determinar la viabilitat de la capacitat infectiva i germinativa d'aquests conidis al llarg del temps segons diferents condicions ambientals

Per realitzar aquest treball s'ha fet un seguiment temporal dels nivells d'inòcul en una finca experimental de perera localitzada a la comarca de la Selva, mitjançant la utilització de plantes i brots trampa. Es van realitzar dos assajos per determinar en quin moment era òptim l'emissió de conidis per part del fong en condicions naturals, per tal de conèixer la seva dinàmica d'esperulació.

En un primer assaig finestres va consistir en embossar diferents brots d'arbres de perera de la varietat Passe Crassane i deixar-los protegits durant un espai de temps determinat de les possibles infeccions per part dels conidis. Cada 10 dies es desembossaven 3 brots per repetició per tal de deixar els brots exposats a les condicions naturals durant 10 dies, i poder predir si hi havia hagut període d'infeccions en aquest període en que els brots quedaven desprotegits. Els resultats no van ser els esperats a causa que es va haver de finalitzar l'assaig abans del previst a causa del trencament de les bosses utilitzades.

En el segon assaig finestres en plantes s'emplaçaven a camp plantes de perera de la varietat Conference durant 10 dies i llavors es portaven al laboratori i es deixaven en humectació a 22°C durant 24 hores per induir les infeccions, així es determinava si hi havia hagut inoculació durant els 10 dies emplaçades a camp. Els resultats van mostrar una bona relació entre els moments de màxima infecció i les prediccions de risc d' esporulació obtingudes amb el model Spor.

La viabilitat dels conidis observant la figura que s'ha obtingut d'aquest any, coincideix amb el final de la temporada quan es donen períodes en què hi ha més esporulacions i a conseqüència més infeccions que a la resta de l'any.

Per determinar la viabilitat de d'inòcul i la seva capacitat de produir infeccions per part del fong es va fer un assaig al hivernacle que es va fer amb dues repeticions, consistia en inocular plantes, deixar-les sota condicions d'hivernacle i cada 10 dies es portaven lots de plantes al laboratori i es deixaven en humectació a 22°C durant 24 hores per induir les infeccions, posteriorment s'avaluaven els danys produïts per la malaltia. En la primera repetició els resultats es va veure que els conidis d'*S.vesicarium* seguien sent viables fins a 50 dies. La segona repetició va finalitzar abans del previst a causa de la infecció de totes les plantes reserva que es tenien en hivernacle.

I finalment es va fer un altre assaig en el que es volia determinar la viabilitat dels conidis en funció del temps i sota condicions controlades amb diferents condicions ambientals de temperatura (5,10,15,20 i 27 °C) i humitat relativa (60, 80, 96,98 i 100%). Per aquest assaig es van utilitzar cobreobjectes per impregnar-los de conidis i dipositar-los dins de vials amb diferents solucions salines que proporcionaven diferents percentatges d'humitat esperats, aquests vials amb conidis amb diferents humitats depenent de les temperatures s'introduïen en diferents neveres per proporcionar les temperatures desitjades. Es va observar que la germinació dels conidis disminuïa dràsticament (60-70%) els 3 primers dies i després la supervivència tenia una relació directe amb la temperatura. A més temperatura més capacitat germinativa per part dels conidis. No es van observar relacions directes entre la viabilitat de la capacitat germinativa dels conidis i la humitat relativa.

# AGRAÏMENTS

No hagués estat possible la realització d'aquest Treball Final de Carrera sense l'ajuda d'un seguit d'organismes i persones que m'agradaria donar-los hi les molt sinceres gràcies:

A l'INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA) DEL MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA per finançar aquest Treball Final de Carrera, desenvolupat en el marc del PROJECTE RTA03-66.

A l'INSTITUT DE TECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIA i al Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal (CIDSAV) i a la Universitat de Girona per facilitar-me el material i les instal·lacions per fer els diferents assajos i elaborar aquest Treball Final de Carrera.

A l'Isidre Llorente per comptar amb mi per la realització d'aquest projecte, per la humanitat que m'ha mostrat sempre des de la primera classe que vaig assistir amb ell; A tu Isidre que m'has descobert un món molt interessant, moltes mercès!!!

A l'Albert Vilardell, per la seva ajuda incondicional, el seu suport i motivació diari en aquest treball. Moltes gràcies per totes les explicacions, per la paciència i per ser com ets, i a la Gemma per les dades del hobo i per ser l'alegria de l'Albert. Per totes les bones estones, sortides a camp etc, que hem compartit en la realització d'aquest treball tots tres. Danke!!!!

Al Sr. Rovira, per deixar realitzar els assajos en la seva finca comercial.

A en Josep Pereda, per la preparació del material vegetal, l'estació meteorològica.

A l'Olga, la Cun, la Lourdes, en Jordi, en Jesús i l'Emili per ajudar-me en qualsevol moment, per fer-me sentir part de la família del CIDSAV.

A tots i cadascun dels professors que he tingut en aquests estudis, a tots ells per haver escollit transmetre els seus coneixements científics a les properes generacions; A tots ells per ensenyar-me la cara més humana de cadascun, per servir-me de guia i exemple en la vida i en la meva pròpia personalitat.

A la meva família!!!!!!, al meu pare per haver estat sempre allà, per ser el meu referent des de sempre. A la meva mare pels bons consells, al meu germà i germana per veurem com sóc. Als avis, als tiets; Per tota la paciència i recolzament en tot moment.

A la meva nova família Holandesa -Andorrana, a l'Anneke i la Sissi.

Als amics...d'estudis, d'esports, de concerts... i a les amigues....

A la mare naturalesa,..... a Darwin ...

..... i a l'Isidre...

# INTRODUCCIÓ

## 1- L'ESTEMFILOSI EN PERERA

L'estemfiliosi és una de les malalties d'origen fúngic amb més importància econòmica en el cultiu de la perera, en diferents zones productives d'Europa.

Aquesta malaltia pot afectar una gran part del cultiu, arribant a ser la causant de fins el 90% de les pèrdues de la producció (Vilardell, 1988)

En l'any 1937 a Itàlia van ser observats els primers símptomes de la malaltia en diferents varietats de pera, pel professor Mezzetti.

En l'any 1975 a la regió d'Emilia Romagna a Itàlia es van detectar de manera oficial els símptomes de la malaltia com a tal. Es va anomenar aleshores "maculatura bruna del pero"(Cavanni and Ponti, 1994).

La malaltia es va estendre per tota la costa del Mediterrani, pel sud de França per la Vall del Ródan (Batllori, 1984; Blancard *et al.*, 1989) i cap als voltants del 1982 a Catalunya per tota la província de Girona, coneguda amb el nom de taca bruna (Vilardell, 1988).

Als voltants de l'any 1996, aparegueren focus de la malaltia en zones d'Aragó, d'Euskadi, d'Extremadura i de La Rioja (de la Cruz *et al.*, 1997). Països actualment afectats per aquesta malaltia són també Portugal i Holanda (Llorente and Montesinos *et al.*,2006) Fig 1.



**FIG.1** Localització de les àrees afectades per estemfiliosi de la perera a Europa (Llorente and Montesinos,2006).



## 2- LA MALALTIA I LA SEVA SIMPTOMATOLOGIA

L'estemfiliosi és una malaltia provocada pel fong *Stemphylium vesicarium*. Els danys provocats es troben en les fulles i els fruits de la planta. Es veuen afectats també brots tendres; essent en els fruits els danys de més importància econòmica de la malaltia.

Els primers símptomes de la malaltia es manifesten com una sèrie de petites taques necròtiques localitzades en les fulles tendres, normalment solen sorgir cap a finals de maig. Aquestes s'estenen per tota la superfície de la fulla, augmentant en nombre de taques i tamany fins a la defoliació, en atacs severos. Cap a finals de juny comencen a manifestar-se símptomes en fruits, aquests poden aparèixer sense que hi hagi hagut abans cap apreciació simptomatològica en les fulles. S'aprecien taques necròtiques en els fruits provocades per una necrotoxina sintetitzada pel fong (Ponti *et al.*, 1982; Montesinos *et al.*, 1996).

En algunes varietats s'observa aureoles vermelloses al voltant d'aquestes taques necròtiques. Es pot apreciar aquets símptomes en la figura 2.

En els llocs més externs de l'arbre es on es manifesten més aquestes taques concèntriques marrons, que a la llarga originaran una mena de depressió endurida en la superfície del fruit i per on entren fongs sapròfits, afectant per tant la seva presentació i aspecte, així doncs deprecials en el moment de la recol·lecció.

Els fruits afectats són de mala comercialització.



**FIG.2** Simptomatologia de l'estemfiliosi en fruit i fulla.

### 3- RESISTÈNCIA DE LA MALALTIA PER LES DIFERENTS VARIETATS DE PERERES

A nivell europeu es pot dir que les varietats cultivades ofereixen diferents nivells de sensibilitat (Montesinos *et col.*, 1996).

Si es fes una divisió en tres categories de sensibilitat quedarien les varietats amb **molta susceptibilitat**: Duc de Bordeaux, Alexandrine, General Leclerc, Passe Crassane, Conference , Doyenne du Comice i Abate Fetel. Aquestes varietats més sensibles són també les que tenen millor i més bona comercialització. Les de més demanda pels consumidors.

Varietats amb **poca susceptibilitat**: Blanquilla, Beurre, William, Louis, Grand Champion, Hardy, Bonne.

I les varietats com Kaiser, Einter Nellis i Rocha serien amb una mitjana susceptibilitat.

### 4- AGENT CAUSANT DE L'ESTEMFILIOSI

L'agent causant de la malaltia es un fong anomenat *Stemphylium vesicarium*, que dona nom a la malaltia de l'estemfiliosi.

### 5- CARACTERÍSTIQUES I BIOLOGIA DEL FONG

És un fong Deuteromicet dels anomenats fongs imperfectes.

Fong amb **dues Fases**, una **vegetativa** o **sexual** en que el passa en forma de *Pleospora allii* (Ascomicet) i que troba en les restes de plantes infectades el medi per desenvolupar-se.

*Pleospora allii* correspon a l'etapa perfecta del fong que apareix durant la fase hivernal, sexual o perfecta en les fulles infectades o fruits al final de l'estació de creixement, en forma de cossos fructífers (pseudotecis), estructura més o menys tancada de color negre, globosos, de 0.1 a 0.5 mm de diàmetre i amb una obertura o ostíol en la part superior. Quan aquests maduren contenen ascis en forma de porra (26x131 µm), en l'interior de les quals s'hi troben les espores

sexuals (ascòspores) de forma elipsoidal-oval, de color daurat, amb 3-7 septes transversals i unes dimensions de 14x32  $\mu\text{m}$  (Ponti *et al.* 1982; Basallote *et al.* 1996) (Figura 3).



**FIG.3** Ascòspores de *Pleospora allii* en l'interior dels ascus a punt d'alliberar-se (Llorente and Montesinos, 2006).

**Fase reproductiva o asexual** caracteritzada per la producció de conidis (espores produïdes genèticament iguals com a resultat d'un procés asexual) per part dels conidiòfors o hifes.

Els conidiòfors tenen aspecte cilíndric, de color castany clar, no ramificats, que emergeixen de l'estroma, poden estar lliures o agrupats en un nombre variable, amb la cèl·lula apical allargada d'un color més fosc.

Els conidis tenen una forma ovalada (12-22x25-48 $\mu\text{m}$ ) amb d'una a tres constriccions transversals, d'una a tres sèries longitudinals, i un nombre variable de septes transversals (Ponti and Cavanni, 1982; Bassallote *et col.*, 1996) (Figura 4).



**FIG.4** Conidiòspores d'*Stemphylium vesicarium* amb hifes observats al microscopi òptic (Llorente and Montesinos,2006).

Per tant es un fong amb una fase de tardor - hivern, que correspon a la forma sexual (*P. allii*), i una segona fase que correspon a la primavera - estiu constituïda per la fase asexual (*S. vesicarium*).

Aquesta fase asexual es en la que es centrarà en el present treball per la importància dels conidis en la disseminació, la penetració i la invasió o colonització d'espais inter e intracel·lulars dels teixits de les plantes més susceptibles.

## 6- CLASSIFICACIÓ TAXONÒMICA DEL FONG

**Fase sexual** (Sierra, 1991).

CLASSE:	ASCOMYCETS
ORDRE :	Ascomicètides
FAMÍLIA:	Loculomicets
SUBFAMÍLIA:	Pleosporiàcies
GÈNERE:	<i>Pleospora</i>
ESPÈCIE:	<i>allii</i> (Rabenh

Taxonomia en l'estadi vegetatiu de la **Fase asexual** (Fantino *et al.*,1991).

CLASSE: DEUTEROMYCETS  
ORDRE : Hifomicetals  
FAMÍLIA: Dematiàcies  
SUBFAMÍLIA: Dictiosporàcies  
GÈNERE: *Stemphylium*  
ESPÈCIE: *vesicarium* (Wallr)

## 7- CICLE DE LA MALALTIA

### 7.1 Multiplicació del patogen

La producció d'espores en la fase hivernal o sexual *Pleospora allii* en forma de cossos fructífers (pseudotecis), es dona quan aquets pseudotecis maduren, i en els ascus continguts en el seu l'interior hi ha les espores sexuals (ascòspores).

En la fase asexual els conidis són produïts pels conidiòfors.

### 7.2 Conservació de l'inòcul

En la fase vegetativa que el passa en forma de *P. allii* troba en les restes de plantes infectades el medi per desenvolupar-se i conservar-se per quan arribin millors condicions.

També en restes vegetals, o en el mateix sòl hi troba un medi ideal per a la conservació de l'inòcul.

### 7.3 Disseminació

A la tardor es comencen a formar els pseudotecis de *P. allii*, que maduren a finals de l'hivern. A l'inici de la primavera, que les condicions són les òptimes, alliberen les ascòspores fins llavors recloses en l'interior i que dipositant-se en

les superfícies foliars i de fruits, provocaran suposadament les infeccions primàries.

#### **7.4 Germinació i Penetració**

La temperatura òptima per a la germinació dels conidis d'*S.vesicarium* és de 28°C (Montesinos *and* Vilardell, 1992); aconseguint un 50% de la germinació dels conidis en només 60 minuts. Aquesta velocitat de germinació explica la rapidesa en què un arbre es pot veure afectat per aquesta malaltia (Llorente, 1997).

La penetració del patogen té lloc per les obertures naturals del teixit vegetal (estomes i lenticel·les) (Montesinos *et al.*, 1996).

#### **7.5 Infecció**

Les condicions suficients per a la infecció de la planta, són entre unes 10 i 12 hores d'humectació continuada a una temperatura de 18 a 24°C (òptim 21-23°C) (Montesinos *and* Vilardell, 1992; Montesinos *et al.*, 1995b; Basallote *et al.*, 1996; Llorente *et al.*, 2000; Llorente *and* Montesinos, 2002).

## 8- CICLE BIOLÒGIC DEL PATÒGEN



**FIG. 5** Cicle biològic del patògen *Stemphylium vesicarium* (forma asexual) i *Pleospora allii* (forma sexual), (Modificat a partir de Llorente, 1997).

## 9- EFECTE DELS FACTORS CLIMÀTICS EN L'INOCUL PRIMARI

Els factors climàtics com la temperatura, la precipitació, la humectació, la llum i el vent són decisius per l'alliberació i transport dels fongs (MacHardy, 1996; Basallote-Ureba *et al.* 1999; Ferrer, 2000; Prados-Ligero *et al.*, 2002).

En la fase sexual o hivernal, el fong es troba en forma de cossos fructífers. Aquests pseudotecis actuaran com a mecanismes de defensa davant condicions desfavorables per al creixement del patogen.

La **Temperatura** es un dels factors importantíssims per d'obtenir unes condicions òptimes pel desenvolupament del patogen, ja que aquest necessita d'unes determinades temperatures mínimes.

A temperatures diürnes inferiors a 10°C es va comprovar que s'obtenia poc efecte sobre la dispersió d'espores de *V. inaequalis* (MacHardy and Gadoury, 1986); i a temperatures de 2°C es podia arribar a frenar la descàrrega d'ascòspores de *V. inaequalis* (Gadoury, 1992).

Els moments òptims d'esperulació d'alguns fongs, té lloc en períodes curts d'humitat amb elevades temperatures (MacHardy, 1996 ; Basallote *et al.*, 1996).

La **humectació** deguda moltes vegades a les precipitacions en forma de pluja o les condensacions es un altre factor decisiu i responsable de l'inici de l'alliberació d'ascòspores de *Pleospora allii*.

Es relaciona la quantitat de conidis continguts en l'aire amb la quantitat d'aigua precipitada. Per a les alliberacions no cal pluges continuades sinó que n'hi ha prou amb un percentatge alt d'humitat (Ferrer, 2000), però la gran majoria de les alliberacions apareixen com a resposta de períodes curts o llargs de precipitació.

La **llum** es també un dels elements importants en el moment de l'alliberació d'ascòspores. Un estudi amb *P. allii* va demostrar que no es detectava cap efecte directe entre l'alliberació i les hores de llum (Ferrer, 2000).



L'alliberació d'ascòspores en general es veuen minvades durant els períodes de foscor en altres fongs; i durant el següent període de llum sovint es tornen a alliberar (Aylor *and* Sutton, 1992). Un altre factor climàtic que actua com a mecanisme de dispersió d'espores és **el vent**.

## **10- EFECTE DELS FACTORS CLIMÀTICS EN L'INOCUL SECUNDARI**

L'alliberació dels conidis varia molt d'un any a l'altre. En all s'ha observat que es poden alliberar igualment conidis sense necessitat d'haver precipitacions (Basallote-Ureba *et al.*,1999 ; Ferrer, 2000).

Estudis previs han relacionat l'esperulació de *S. vesicarium* en relació a paràmetres ambientals com la humitat relativa, la temperatura i la precipitació (Basallote-Ureba *et al.*,1999; Ferrer, 2000; Prados-Ligero *et al.*, 2002 ). Tot i això no s'ha determinat la viabilitat d'aquests conidis emesos al llarg del temps.

L'**SPOR** és un programa de predicció de producció d'espores elaborat per un grup d'investigació de la Universitat dil Sacro Cuore (Piacenza) i el Servizio Regionale de Fitosanitarie d'Emilia Romagna, el qual en funció de diversos paràmetres com són la **temperatura**, **humitat relativa** i la **humectació**, (així com l'**estacionalitat**), prediu un nivell d'esperulació d' *S.vesicarium*.

## **11- MÈTODES DE CONTROL DE L'ESTEMFILOSI**

Els programes de control integrat de l'estemfiliosi, consideren que en perera s'ha de tenir en compte el cicle biològic de l'agent patogen i el de la malaltia.

## 11.1 CONTROL DE LA FASE SEXUAL (*P.allii*)

Considerada la fase de reservori de la malaltia durant l'hivern el fong es troba en forma de *P. allii*, aquesta es localitza en restes de fulles i fruits en forma de pseudotecis.

El reservori d'inòcul primari quan més gran sigui, més conseqüències i probablement majors danys es tenen de la malaltia en l'etapa vegetativa.

Els mètodes utilitzats es centren en reduir la presència d'inòcul en restes de fulles i fruits afectats que es troben en el terra; es centraran en aquelles restes afectades que ja han caigut al terra i que són una font important d'infeccions.

Quan s'aconsegueix reduir la quantitat d'inòcul primari es redueix també el nombre d'infeccions primàries. Hi haurà una disminució del nivell de la malaltia.

### Pràctiques culturals

El que es fa en general quan el nivell de danys en anys anteriors ha estat elevat, és retirar les restes de fulles caigudes i fruits en el camp per tal d'eliminar quan més part del reservori present en el sòl, millor.

Un altre mètode està dedicat a la reducció d'inòcul primari que consisteix en el trinxat de les fulles caigudes per accelerar la seva descomposició.

### Control Biològic

Mètodes de **control biològic** en què s'utilitzen altres organismes per tal de reduir total o parcialment la població del patogen.

En el cas de l'estemfiliosi s'han fet assajos amb relativa eficàcia amb alguns productes comercials a base del fong *Trichoderma spp*, amb l'objectiu de reduir la quantitat d'inòcul primari que actua com a reservori (Parrón, 2000; Llorente *et al.*,2006)

Els inconvenients d'aquests mètodes biològics són que es treballa amb organismes vius i tenen una durabilitat limitada de vida i unes condicions ambientals molt particulars pel seu desenvolupament.

## **Control Químic**

Pel control químic es treballa principalment amb components derivats de d'urea.

Els components que porten urea fan tractaments segurs, econòmics, de fàcil aplicació i que no provoquen resistències en el patogen (Filajdic *and* Sutton, 1995). Les aplicacions d'urea a la tardor permeten eliminar en gran part, el reservori d'inòcul present durant l'hivern sobre les restes de fulles i fruits (Canestrone *et al.*, 1988), però d'altres estudis no corroboren això (Parrón, 2000; Llorente *et al.*, 2006).

### **11.2- CONTROL DE LA FASE ASEXUAL (*S.vesicarium*)**

El període vegetatiu de la perera durant la primavera i l'estiu és on apareixen les **infeccions secundàries** provocades per la fase en forma d' ***Stemphylium vesicarium***.

### **Pràctiques culturals**

Per evitar que la malaltia es pugui propagar amb facilitat s'intenta aconseguir varietats amb poca sensibilitat a la malaltia (Cavanni *and* Ponti, 1994; Montesinos *et al.*, 1995).

Es tenen en compte també les característiques de la finca i la implementació del cultiu.

S'intenta evitar el reg per aspersió perquè pot afavorir l'escampament de la malaltia degut a que aconseguix una humectació en la superfície de les fulles força més elevada que qualsevol altre mètode de reg (Brunelli *et al.*, 1983; Ferrari *et al.*, 1996).

### **Control químic**

Els principis químics més utilitzats en fungicides i més eficaços en el control de l'estemfiliosi de la perera són els components ditiocarbamats, dicarboximides, estrobilurines i triazols (Brunelli *et col.*, 1986; Vilardell, 1988; Brunelli, 1996).

En els ditiocarbamats es troben el TMTD i el Mancozeb, són molt eficaços aplicats cada 7 dies.

Dins les dicarboximides, la procimidona i la iprodiona són les que presenten més eficiència aplicades cada 15 dies.

Els derivats de les estrobilurines, el kresoxim-metil ofereix una bona eficàcia com a preventiu (Rodríguez, 1998).

En el grup dels triazols, el tebuconazol també s'usen amb bons resultats en el control de la malaltia.

S'ha observat que aquests productes perden eficàcia en plantacions comercials amb un nivell de danys superior al 75% (Montesinos *et al.*, 1996).

El principal problema que presenta la utilització d'aquestes substàncies químiques és la necessitat d'un important nombre d'aplicacions com en el cas del Thiram es de 20 a 25 tractaments amb l'objectiu de controlar la malaltia durant el període vegetatiu.

Les aplicacions continuades de productes químics, pot provocar efectes secundaris com deposicions de residus en els fruits, impactes sobre la plantació debilitant la planta així com impactes en el sòl i en nivells freàtics, essent perjudicials per a la salut humana i el medi ambient, a causa del seu elevat grau de residus. Això és incompatible en programes de producció integrada.

Cada vegada més l'objectiu es centra en racionalitzar al màxim les aplicacions d'àmbit preventiu.

S'han observat que les condicions òptimes pel desenvolupament de la malaltia al llarg del cicle vegetatiu de la perera, no es mantenen constants degut a la variabilitat climatologia local.

Per tan només es pot dur a terme una bona racionalitat quan, es coneix el cicle biològic del patogen, i les condicions ambientals que condicionaran el desenvolupament de la infecció.

## **Models de predicció de risc d'infecció**

El model anomenat **BSPcast** (Brown Spot of Pear Forecast).

Relaciona la severitat de la malaltia amb les hores d'humectació i les temperatures mitjanes del període d'humectació (Montesinos *et al.*, 1995a).

El model determina també en quin moment les condicions són favorables per a l'aparició d'infeccions provocades per *S. vesicarium*.

El fet que es pugui predir en quin moment es pot començar a desenvolupar la malaltia i determinar les dates d'aplicació fitosanitàries pel control d' *S. Vesicarium*, permet un estalvi considerable en les aplicacions de fungicides químics. Els resultats observats han estat que el nivell de la malaltia no difereix significativament entre el tractament preventiu i el guiat, però s'aconsegueix un estalvi entre el 26-50% de les aplicacions de fungicides (Llorente *et al.*, 2000).

L'eficiència del model BSPcast pot millorar amb la informació de les previsions del nivell d'inòcul present i de la sensibilitat dels estadis fenològics i de la varietat de pera cultivada (Llorente *et al.*, 1999).

El desenvolupament de la infecció recentment s'ha comprovat que es veu afectat pels períodes discontinus d'humectació, fet que pot disminuir encara més les aplicacions del producte fungicida utilitzat (Llorente *and* Montesinos, 2002).

El model **BSPcast** s'està utilitzant actualment en zones de Girona, Lleida, la Rioja, Portugal, Itàlia, Bèlgica i Holanda (Llorente *and* Montesinos, 2006).

Per incrementar l'eficiència del BSPcast i disminuir el nombre de tractaments interessa conèixer no només quan hi ha condicions ambientals favorables a l'inici d'infeccions, sinó en quins moments s'està produint inòcul.

# OBJECTIUS

Determinar la dinàmica d'esperulació i emissió de conidis d' *S.vesicarium* en finques comercials de pereres.

Avaluar el model SPOR com a predictor de l'esperulació dels conidis d'*S.vesicarium*.

Determinar la viabilitat de la capacitat germinativa dels conidis al llarg del temps amb diferents condicions ambientals d'humitat i temperatura.

# MATERIAL I MÈTODES

Per tal de poder obtenir dades de la dinàmica d'esperulació del fong en perera i de determinar la viabilitat dels conidis en funció de paràmetres ambientals, s'han dut a terme diferents assajos paral·lels aprofitant l'estació de l'any en què el fong està en fase asexual.

Per a l'estudi s'han realitzat 3 assajos diferents:

- **1- ASSAIG FINESTRES EN BROTS**
- **2- ASSAIG FINESTRES EN PLANTES**
- **3- ASSAIG DE VIABILITAT DE L'INÒCUL**

Els tres primers assajos que corresponen al de Finestres tant en brots com en plantes com l'assaig de mesura d'inòcul a camp s'han realitzat paral·lelament i simultàniament per tal de determinar la dinàmica d'esperulació dels conidis.

## 1- ASSAIG FINESTRES EN BROTS

### 1.1 OBJECTIU

L'assaig va consistir en determinar en quin moment era òptim l'emissió de conidis per part del fong en condicions naturals. Per tal de conèixer la seva dinàmica d'esperulació. Així com relacionar-ho amb les prediccions del model SPOR.

### 1.2 CARACTERISTIQUES

Fou realitzat en una finca experimental (Can Rovira) situat al terme municipal de Fornells de la Selva (Girona).

Es van utilitzar 3 fileres per l'assaig a camp. Cada filera corresponia a una repetició.

La varietat de perera cultivada en aquest camp d'assaig corresponia a la varietat **Passe crassane**.

L'assaig iniciat a finals d'abril de 2006, consistia en escollir diferents brots a l'atzar (aproximadament 80 brots) dels arbres de cadascuna de les tres repeticions, i amb bosses transpirables embossar els brots escollits.

La finalitat d'embossar aquests brots es feia per tal que les fulles dels brots quedessin aïllades i protegides de possibles emissions de conidis d'*S.vesicarium*, evitant així que es dipositessin aquests en fulles.

Els brots quedaven protegits en bosses fins que es procedia a desembossar 3 dels brots escollits a l'atzar per cada repetició del total de brots embossats, quedaven desprotegits i per tant sotmesos a possibles emissions de conidis durant un període de temps aproximat de 10 dies (Figura 6).

Per tant el disseny experimental consistia en 3 repeticions amb 3 brots per repetició per cada data de desembossament, amb diferents períodes de temps.

En l'assaig es pretenia fer espais de temps de 10 dies en 10 dies per valorar els efectes ocasionats en els brots durant aquests espais de temps.

Els símptomes que s'observarien al final de l'assaig (moment de collita) correspondrien a l'inòcul establert durant el període descobert i es podria correlacionar amb els paràmetres climàtics obtinguts durant aquest període.



**FIG.6** Vistes del camp de Can Rovira on duien a terme els assajos. Es veuen els brots etiquetats i embossats.

Com a controls, quan es procedia a la retirada de les bosses es valoraven 10 fulles de cada brot desembossat. Passat 10 dies del seu desembossament es feia una altra valoració de 10 de les fulles de cadascun dels brots (Figura 7).



### 1.3 AVALUACIÓ DEL NIVELL DE MALALTIA

Les valoracions en aquest assaig es feien sobre 10 fulles de cadascun dels brots, es comptaven les taques presents en cada una de les fulles i el seu grau d'incidència (% de fulles amb lesions) i severitat s'obtenia amb un índex que va del 0 al 3, en el qual el 0 significava la no presència de taques, l'1 representava de 1 a 5 taques per fulla, l'índex 2 de 5 a 25 per fulla i l'índex 3 amb més de 25 taques per fulla.



**FIG.7** Danys en fulles produïdes per la presència d'*S.vesicarium*; Es pot observar com i de quina manera es manifesta la malaltia i els diferents nivells o índex d'incidència sobre les fulles en cadascun dels casos.

Per a l'obtenció de dades climatològiques a camp es va instal·lar una estació meteorològica tipus CRIOX (Campbell Scientific Ltd) amb sensors de Temperatura, Humitat relativa i Humectació.

## 2- ASSAIG FINESTRES EN PLANTES

### 2.1 OBJECTIU

Consistia en un assaig amb la finalitat de complimentar l'obtenció de dades per saber si hi havia hagut període d'emissió d' *S.vesicarium*.,en funció de paràmetres ambientals. I així tenir un millor coneixement de la dinàmica d'esperulació d'aquest. Les plantes actuaven com a trampes d'inòcul.

### 2.2 CARACTERISTIQUES

L'assaig es va dur a terme amb plantes de perera de la varietat **Conference**, de 0,3 metres d'alçada aproximadament, mantingudes en containers de 15x15 cm en l'hivernacle fins al moment de portar-les a camp. (Figura 8)

L'assaig es va realitzar en la finca experimental de Can Rovira situat a Fornells de la Selva, on es va realitzar l'assaig Finestres en brots d'arbres de perera cultivats.

Per cada data de transport de plantes des de l'hivernacle a camp es feia una tria de 12 plantes sanes situades a l'hivernacle, d'aquestes 12 plantes només 9 eren traslladades a camp, les altres 3 plantes restants (plantes testimoni) es quedaven en el mateix hivernacle durant 10 dies (els mateixos dies que les plantes que anaven a camp).



**FIG.8** Reservori de plantes per a l'assaig en l'hivernacle de l' EPS.

De les 9 plantes que es traslladaven a camp, es separaven en grups de tres i es posaven entre les fileres d'arbres de la plantació. Per tant es tenien 3 plantes per a cada repetició, es deixaven en testos entre les separacions d'arbre i arbre (Figura 9).

Allà les plantes quedaven exposades a condicions ambientals. Alhora aquestes plantes quedaven sotmeses a possibles emissions de conidis.

Les plantes es deixaven a camp aproximadament 10 dies.



**FIG.9** Plantes en testos emplaçades a camp, exposats a les condicions naturals durant 10 dies aproximadament.

Una vegada les 9 plantes havien passat aquets 10 dies a camp, es retiraven i es duïen a laboratori, per poder assegurar que es produïa infecció s'hi hi havia conidis, es deixaven les 12 plantes (9 que estaven a camp + 3 control), s'humectaven i es cobrien amb bosses, durant 24 hores a 22°C. Aquestes són les condicions més òptimes pel desenvolupament d'infeccions.

Posteriorment, passades 24 hores es treïen les bosses i s'introduïen les plantes a la cambra d'expressió (situada a les instal·lacions de l'EPS de la UdG), aquesta mantenia a les plantes sota unes condicions de temperatura i humitat de 23°C i 80% d'Humitat relativa i passats 1-3 dies es valorava la malaltia determinant la incidència (nº de fulles amb lesions) i la severitat (nº de lesions per fulla).

## 2.3 AVALUACIÓ DEL NIVELL DE MALALTIA

En el cas que la simptomatologia de l'estemfiliosi en les fulles valorades fos molt evident es podria dir que en aquests 10 dies que la planta havia estat exposada a camp hi hauria hagut conidis en fulles i que per tant haurien ocasionat la malaltia a la planta (Figura 10).



**FIG.10** A. Simptomatologia de l'estemfiliosi en fulles. B. Valoració del nivell de malaltia en plantes.

## 3- ASSAIG DE VIABILITAT DE L'INÒCUL

Es van fer dos grups d'assaig per determinar la viabilitat de l'inòcul amb mètodes diferents, sota diferents condicions:

1. VIABILITAT SOBRE PLANTA EN CONDICIONS D'HIVERNACLE
2. VIABILITAT SOTA CONDICIONS CONTROLADES

### 3.1 VIABILITAT SOBRE PLANTA EN CONDICIONS D'HIVERNACLE

#### 1. 1-OBJECTIU

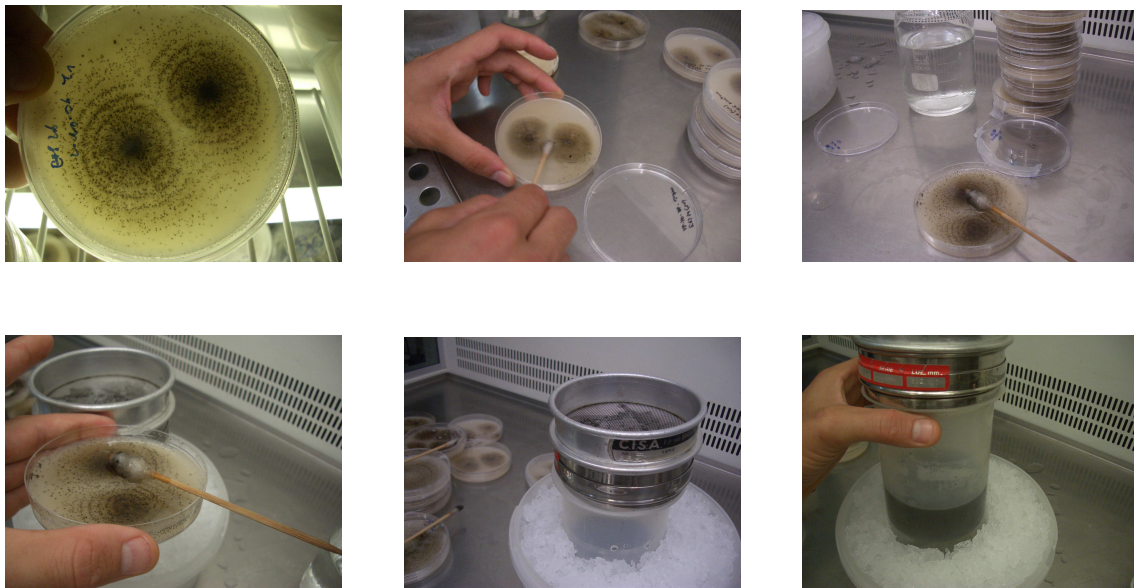
Conèixer la viabilitat de l'inòcul, obtenir dades de la capacitat que té l'inòcul un cop alliberat de produir infeccions.

#### 1. 2-CARACTERISTIQUES

Es va preparar inòcul amb plaques sembrades amb medi V8 de soques d'*S.vesicarium*, la preparació de l'inòcul es va fer amb un raspap de les plaques

amb colònies d'*S.vesicarium*, amb l'ajuda d'aigua freda destil·lada i amb cotonets per tal de separar els conidis amb medi aquós (per evitar que no s'agregessin els conidis es va afegir una solució antiagregant Tween), es va utilitzar també un tamís d'una determinada llum de 0,2 mm per permetre passar només els conidis. D'aquesta manera en el vas de precipitats quedaven els conidis en suspensió (Figura 11).

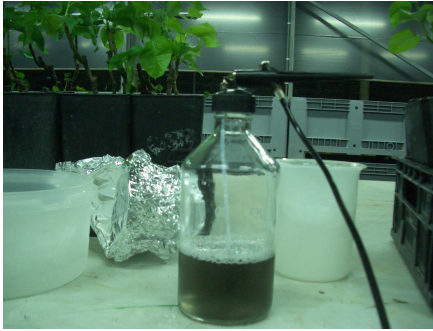
Tot el procés es va fer a 4°C per evitar la germinació prematura dels conidis.



**FIG.11** Raspat de les colònies d'*S.vesicarium* i posterior separació dels conidis amb medi aquós per tamisos amb el resultat de l'obtenció d'inòcul.

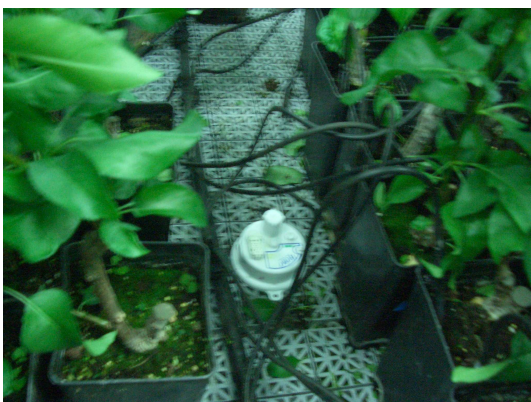
Es va obtenir una solució de  $1,3 \times 10^5$  conidis/ ml, determinada a partir d'una cambra hematocimètrica tipus Thoma.

Una vegada ja preparada la solució de l'inòcul. Es van agafar 48 plantes de perera de la varietat **conference** que venien de l'hivernacle, la meitat d'aquestes per tant 24 plantes, es van inocular amb un polvoritzador, la resta de plantes es van deixar sense inocular(Figura12).



**FIG.12** Inoculació de les plantes amb polvoritzador.

Les 48 plantes que es van utilitzar per l'assaig es van deixar a l'hivernacle exposades a condicions naturals; Les dades climatològiques de Temperatura, Humitat relativa i Humectació quedarien enregistrades en un captador de dades marca HOBO que es va instal·lar a l'hivernacle (Figura13).



**FIG.13** Detall del HOBO entre les plantes emplaçades a l'hivernacle. (Es feia un registre de temperatura i humitat cada hora).

A dins l'hivernacle es van deixar separades les 24 plantes inoculades de les plantes que no ho estaven (Figura 14).



**FIG.14** Plantes inoculades i no inoculades, separades dins l'hivernacle.

Passats 10 dies s'agafaven 3 plantes inoculades i 3 plantes no inoculades, s'embossaven les 6 plantes i es duïen al laboratori a 20°C, durant 24 hores amb humectació per tal d'induir les infeccions.

Al cap de 24 hores es treïen de les bosses i s'introduïen les plantes a la cambra d'expressió a 22°C i es deixava també un HOBO per tal d'obtenir un enregistrament de les dades climàtiques a la cambra durant tot el període de temps que duraria l'assaig, i es valoraven passats 3 o 4 dies (Figura 15).



**FIG.15** Diferència entre dues fulles, una pertany a una planta inoculada on es poden apreciar danys (dreta), i una pertany a la planta no inoculada (esquerra).

### 1. 3-DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE LA MALALTIA

L'assaig es valorava amb el nombre de taques per fulla (20 fulles per planta), S'annotava l'incidència (% fulles amb danys) i la severitat (nº de lesions per fulla) de cadascuna de les plantes (Figura 16).



**FIG.16** Diferents graus de simptomatologia de l'estemfiliosi en fulles, produïda per la inoculació de la planta.

En aquest assaig de viabilitat de l'inòcul, es van fer dues repeticions. La **primera** amb 48 plantes va començar el dia 19/7/2006 i va finalitzar el 7/9/2006 (Taula 1).

Es van fer per aquesta primera repetició de l'assaig, 5 lots de plantes.

La **segona repetició** de l'assaig es van utilitzar 60 plantes en total, de les quals 30 es van inocular.

L'assaig va començar el dia 20/10/2006 i va finalitzar el dia 4/11/2006 en veure que apareixia un nivell de malaltia molt alt en totes les plantes



emmagatzemades, ocasionant baixa a totes les plantes inoculades a l'hivernacle (Taula 2).

**Taula 1.** Dades corresponents als dies des del inici de l'assaig (Primera repetició) quan es van inocular les plantes, els dies de retirada de les plantes de l'hivernacle cap a laboratori on s'humitejaven i seguit a la cambra d'expressió i dates de lectura i valoració dels danys en fulles.

<b>Temps (dies)</b>	<b>Data retirada hivernacle</b>	<b>Data valoració</b>
0	19/7/2006	12/8/2006
9	28/7/2006	2/8/2006
20	8/8/2006	13/8/2006
28	16/8/2006	23/8/2006
50	7/9/2006	12/9/2006

**Taula 2.** Dades dels dies a partir de l'inoculació de les plantes (Segona repetició), dates de retirada dels lots de plantes de l'hivernacle i dates de valoració de cada lot.

<b>Temps (dies)</b>	<b>Data retirada hivernacle</b>	<b>Data valoració</b>
0	20/10/2006	20/10/2006
4	24/10/2006	30/10/2006
10	30/10/2006	3/11/06 i 4/11/06

### 3.2 VIABILITAT SOTA CONDICIONS CONTROLADES

#### 2. 1-OBJECTIU

Determinar la viabilitat de la capacitat germinativa dels conidis en funció del temps i segons diferents condicions ambientals com són la temperatura i humitat relativa.

#### 2. 2-CARACTERISTIQUES

L'assaig consistia en poder tenir conidis en diferents condicions de temperatura i humitat relativa per tal d'observar com incidien aquestes en l'índex de germinació dels conidis.

L'obtenció de conidis es va fer amb una soca d'*S.vesicarium* que s'havia preparat per els anteriors assajos, es disposava de suficients plaques amb colònies del fong.

Es van utilitzar cobreobjectes i cadascun dels cobreobjectes es va impregnar amb silicona líquida per tal d'adherir els conidis presents en les colònies sembrades en plaques. Per fer-ho es pressionava lleugerament el portaobjectes damunt les colònies del fong.

Per poder assegurar diferents humitats relatives es va recorre a una metodologia descrita on s'obtenien humitats relatives a partir de dissolucions sobresaturades de sals (Dhingra,1987) (Taula 3).

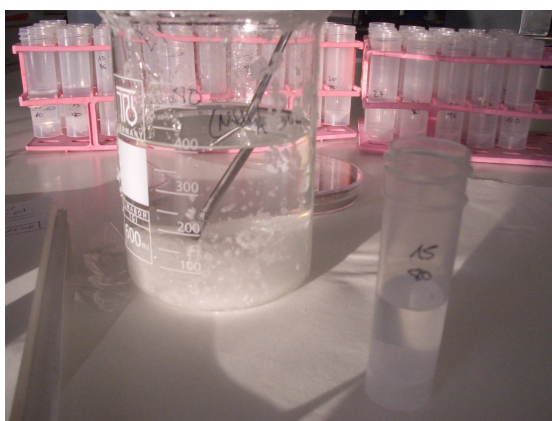
**Taula 3.** Humitats relatives que s'obtenen a partir de les sals, en diferents condicions de temperatura (Dhingha,1987).

Temperatura (°C)	Humitat Relativa (%)	Sals
5,10,15,20,25	60	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6(H <sub>2</sub> O)
5,10,15,20,25	80	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20,25	96	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5,10,15,20,25	98	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

**Taula 4.** Temperatures i humitats relatives assajades.

Temperatura (°C)	Humitat Relativa (%)
5	60
10	80
15	96
20	98
27	100

Una vegada escollides les sals es va procedir a la preparació de les solucions sobresaturades (Figura 17).



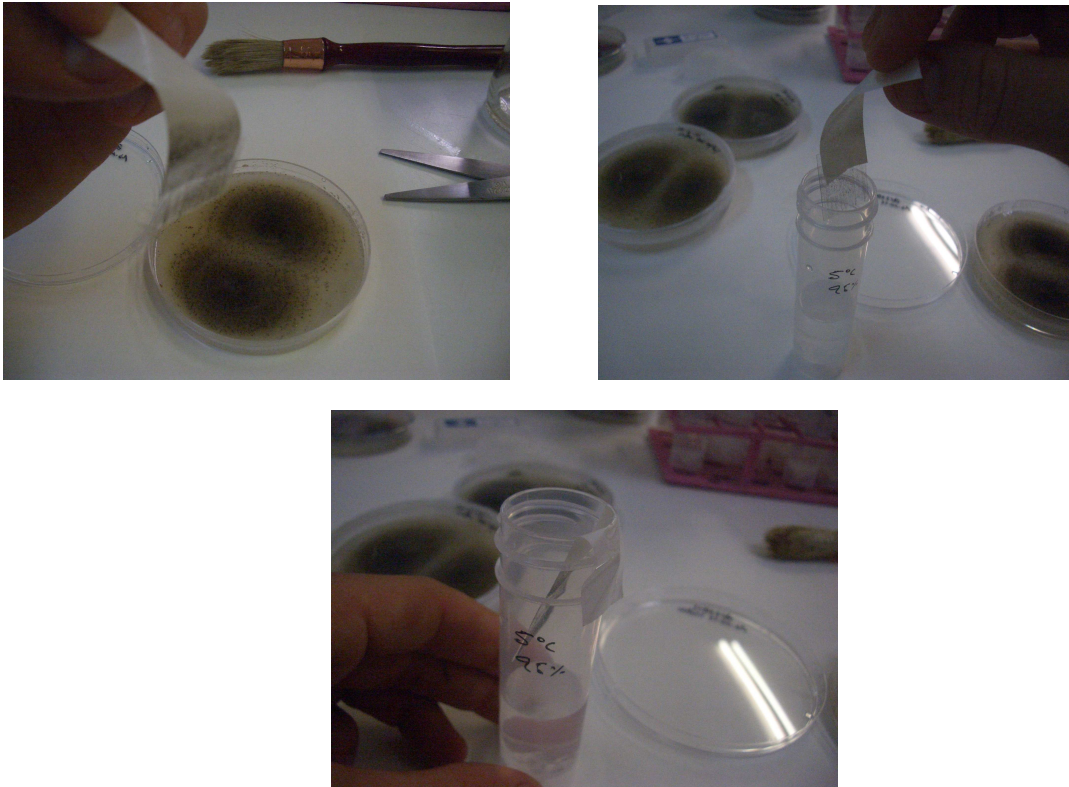
**FIG.17** Preparació de les dissolucions sobresaturades de les sals.

Preparades les dissolucions, es podien veure al cap d'1 dia com s'obtenien sals degut a la cristallització de les solucions.

Es van preparar 25 vials amb 20 ml aproximadament de dissolució salina de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$ , que correspondrien als vials del 60% d'humitat relativa, 25 vials amb  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (80% HR), 25 vials més amb  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  que seria la humitat relativa corresponen al 96 %, i 25 vials amb solució saturada de sals de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , que es garantitzaria una humitat del 98%, i finalment per la humitat del 100%, es van preparar 25 vials amb 20 ml d'aigua estèril.

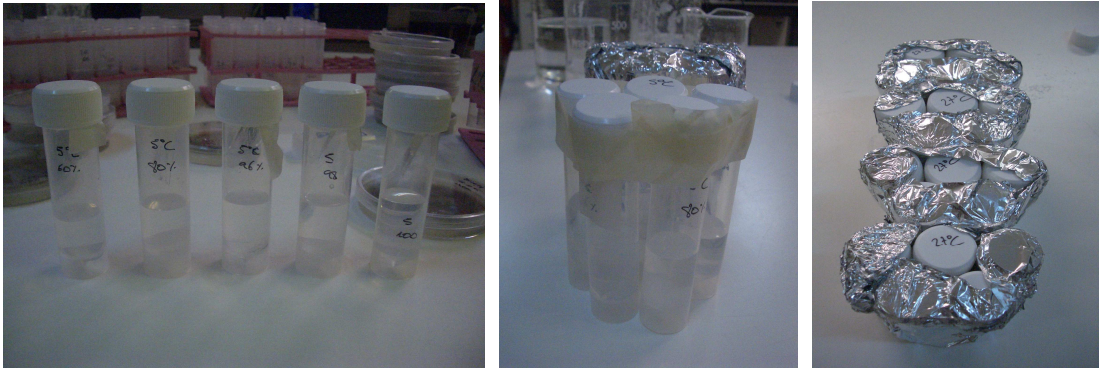
Primerament per poder realitzar l'assaig es van preparar 100 vials per disposar de 25 vials en cada temps de valoració.

Una vegada es tenien els cobreobjectes amb la presència de conidis, i es tenien tots els 100 vials amb la solució corresponent, s'introduïen els cobreobjectes subjectats amb cinta adhesiva dins dels vials, i es tancaven (Figura 18).



**FIG.18** Seqüència de l'adherència de conidis d'*S.vesicarium* en cobreobjectes, i posterior introducció en vials amb solució salina.

En cada temps de valoració es tenien 5 grups. Per tant a cada nevera (hi havia 5 neveres per 5 temperatures diferents), hi hauria un grup format per 5 vials (un per cada HR) (Figura 19).



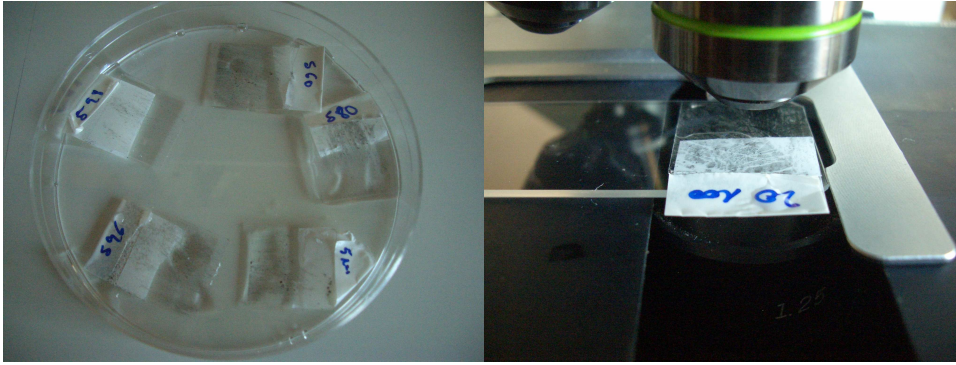
**FIG.19** Vials preparats, agrupats per la corresponent temperatura i diferents humitats, i embolicats amb paper d'alumini per protegir els conidis del fotoperíode, abans de portar-los a les neveres.

**Taula 5.** Dies que passen des del moment que comença l'assaig, on es preparen tots els vials que mantindran als conidis d'*S.vesicarium* en diferents condicions de temperatura i humitat, fins al moment de la valoració dels conidis continguts en cada vial.

<b>Temps (dies)</b>	<b>Data valoració</b>
0	7/11/2006
3	10/11/2006
10	17/11/2006
16	23/11/2006
23	30/11/2006

## 2. 3-DETERMINACIÓ DE LA VIABILITAT

Per cada temps de valoració es treia un grup de vials de cada nevera (5 grups, per tant 25 vials), es retiraven tots els cobreobjectes dels vials, es dipositaven en plaques petri i s'humitejaven tots amb aigua estèril. S'introduïen durant 24 hores en condicions de 20°C, i llavors es retiraven i es valoraven al microscopi (Figura 20).



**FIG.20 A** Cobreobjectes retirats dels vials i desats en les plaques amb humectació a 20°C durant 24 hores. **B** Posterior valoració dels cobreobjectes al microscopi, per determinar l'índex de germinació dels conidis.

En cadascun dels cobreobjectes es realitzaven dues valoracions de 50 conidis cada valoració. Es determinava el percentatge de germinació, considerant germinat un conidi si presentava almenys un tub germinatiu (considerant tub germinatiu aquell que superava en mida l'amplada total del conidi).

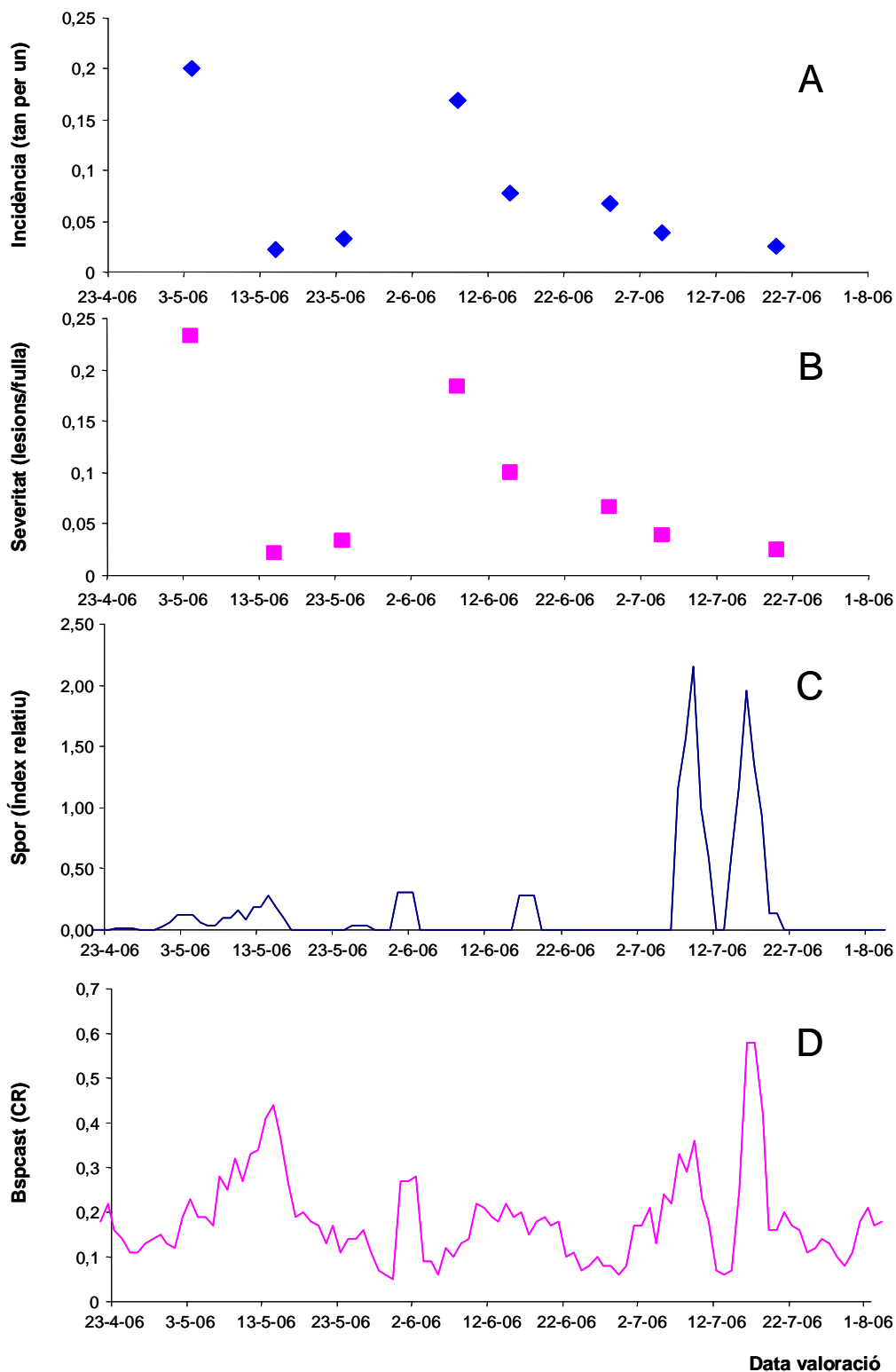
# RESULTATS

## 1- ASSAIG FINESTRES EN BROTS

L'assaig finestres en brots es va començar el dia 25 d'abril coincidint amb períodes d'augment de temperatures i pluges, l'assaig va finalitzar el dia 20 de juliol abans del previst amb motiu que les bosses utilitzades des del primer dia que cobrien els brots a camp es van malmetre i no es va poder seguir l'assaig. Com es pot apreciar, això va incidir en els resultats, no es van tenir els resultats esperats.

La figura mostra la relació entre la incidència (nº de fulles amb lesions) i la severitat (nº de lesions per fulla) respecte el temps i aquestes respecte els moments d' esporulació d'*S.vesicarium* indicats pel model Spor on arribar a un valor superior a 0,3 es considera un moment òptim d' esporulació, alhora també mostra relació respecte els períodes de risc d' infecció determinats pel model Bspcast, on es considera que si es sobrepassa el llindar de 0,4 s' està en un moment de risc d' infecció per la malaltia (Fig.21).

S'observa que no existeix relació entre la incidència i els moments de risc d' infeccions ni tampoc entre moments d' esporulació, tant la gràfica del model Bspcast com la de l' Spor no assoleixen en cap dels mesos compresos de l' estudi cap llindar significatiu que representi una relació amb la incidència i la severitat de la malaltia.



**FIG.21** Dinàmica del període de risc d' esporulació obtingut amb el model Spor (C) i el període de risc d' infecció obtingut amb el model Bspcast (D) relacionat amb la incidència (nº de fulles amb lesions) (A) i la severitat (lesions/fulla) (B) de l' estemfiliosi en brots al llarg de l' assaig. Es considera risc si l' índex Spor  $\geq$  0,3 i l' índex Bspcast  $\geq$  0,4.



## 2- ASSAIG FINESTRES EN PLANTES

L'assaig finestres en plantes va començar el dia 25 d'abril quan es van posar a camp les primeres plantes i finalitzat el 20 d'octubre.

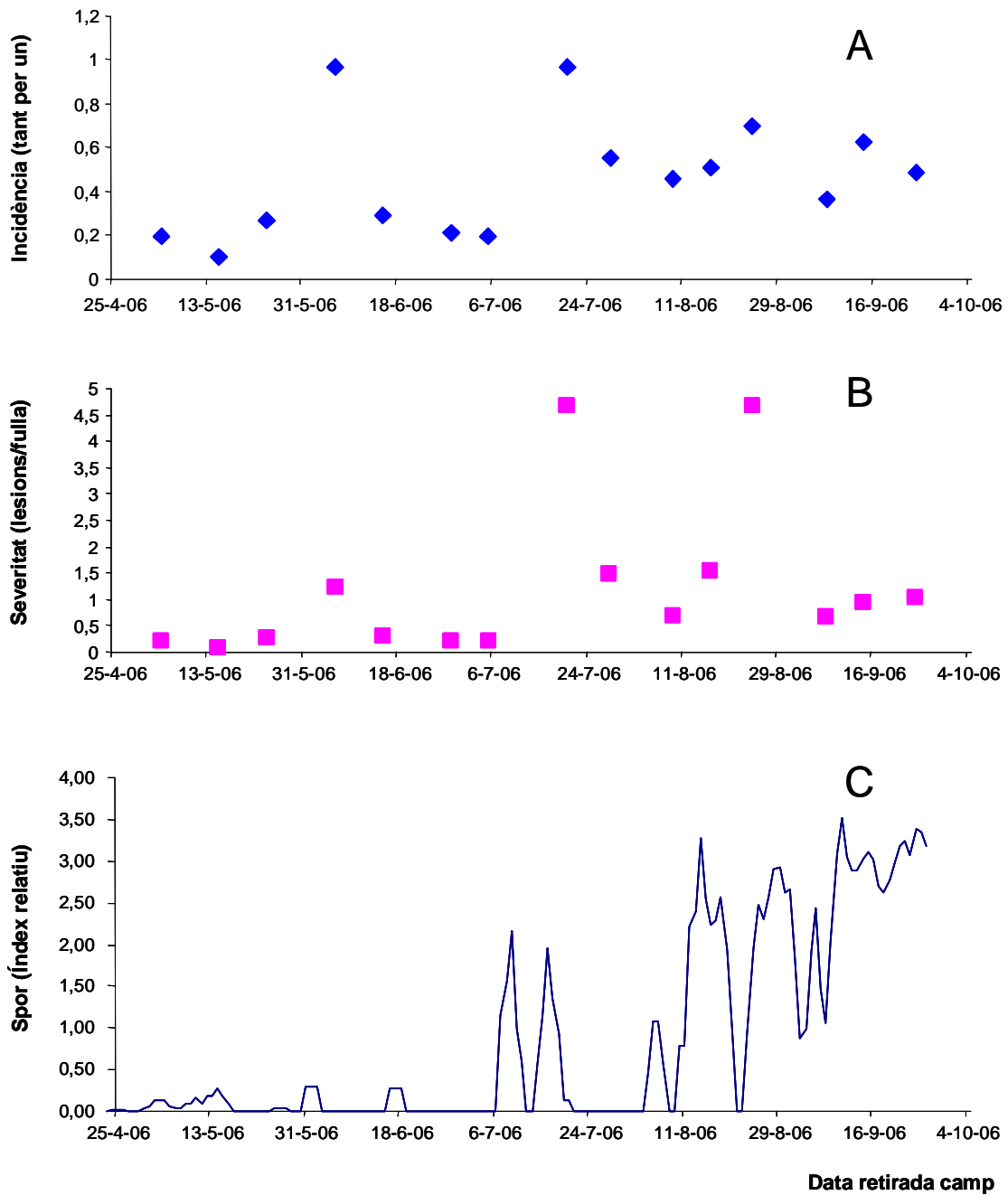
Es pot observar que a partir del model Spor es poden determinar els moments d'esperulació i relacionar aquets amb les incidències de la malaltia i la severitat. A partir de les figures s'observa una bona relació entre les prediccions del model Spor i les incidències de la malaltia observades en plantes (Fig 22).

Els pics de la gràfica del model de predicció Spor que indiquen moments d'esperulació de conidis d'*S.vesicarium* al llarg de l'assaig, coincideixen en alguns moments enregistrats de valors elevats d'incidències de l'estemfiliosi.

S'observa una relació força clara en la majoria dels punts.

Dos punts que coincideixen quan hi ha un pic important de risc d'esperulació s'observen uns nivells d'infecció importants.

Es pot observar que en els moments de més incidències en l'assaig, més alts han estat els valors enregistrats corresponents a la severitat de la malaltia.



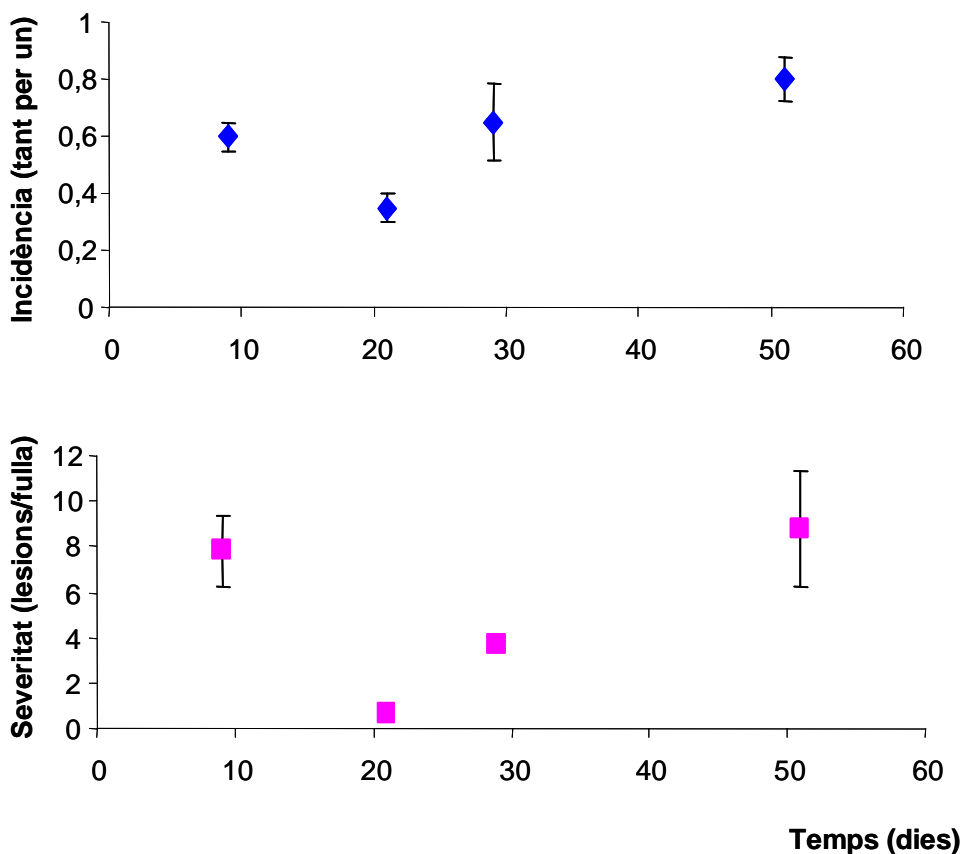
**FIG.22** Incidència de la malaltia (nº de fulles amb lesions) (A) i la severitat d'aquesta (lesions/fulla) (B) en plantes. Risc d'esperulació obtingut amb el model Spor (C), es considera risc si l'índex es  $\geq 0,3$ .

### 3- ASSAIG DE VIABILITAT DE L'INÒCUL

#### 3.1- VIABILITAT SOBRE PLANTA EN CONDICIONS D'HIVERNACLE

Es va determinar la incidència i la severitat de la malaltia que presentaven les plantes inoculades al llarg del temps.

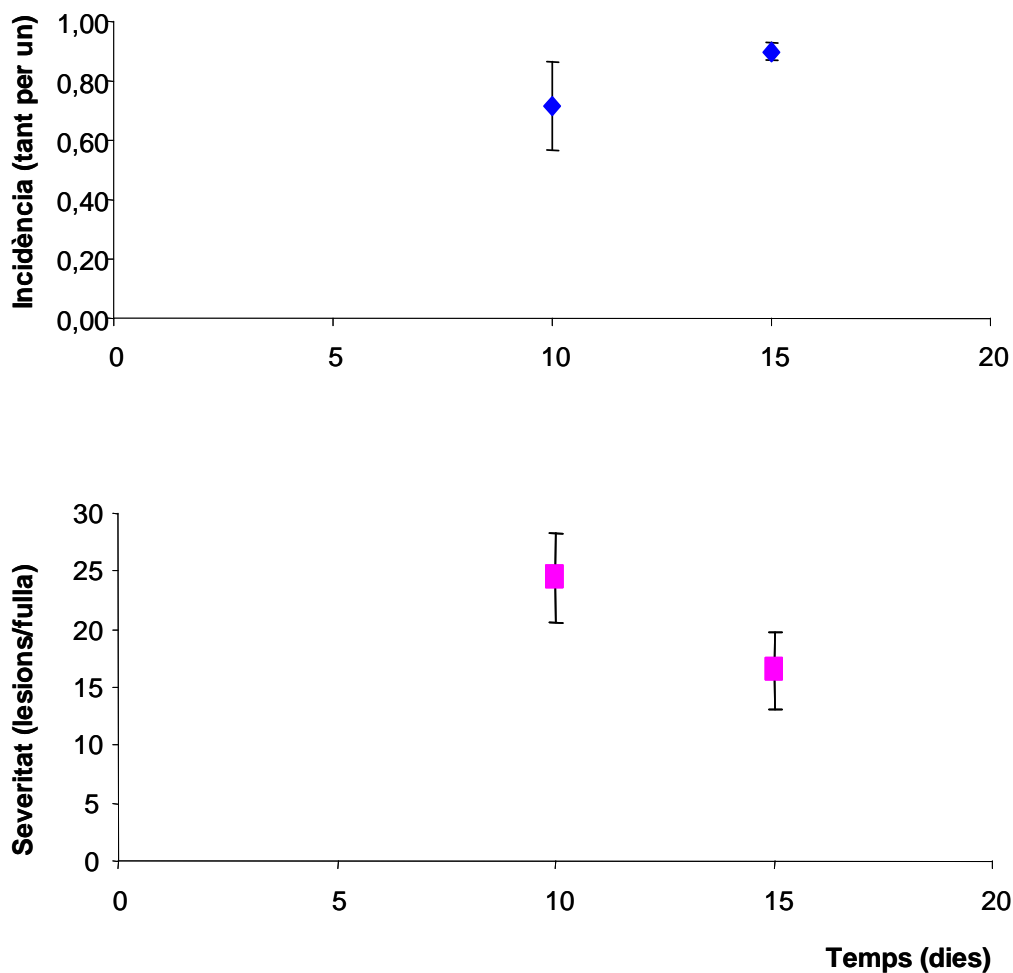
Els nivells d'infecció que s'observen a partir de la figura 23 mostra com la presència d'inòcul en planta en l'assaig de la primera repetició encara perdura després d'un llarg període de temps, causant infeccions significatives al cap de 50 dies (Fig. 23).



**FIG.23** Incidència (fulles amb lesions) i severitat (lesions/fulla) de l'estemfiliosi al llarg del temps un cop inoculades les plantes en el temps 0 (primera repetició).

En la segona repetició el període de temps en què es determinen les incidències en plantes es relativament curt, però molt significatiu com s'aprecia

en la figura, ja que en tan sols en 5 dies les incidències de la malaltia augmenten molt, ocasionant baixes als lots de plantes inoculades que s'utilitzarien per l'estudi en posteriors períodes de temps, com a conseqüència de les importants baixes es va haver de finalitzar l'assaig al cap de 15 dies des de la inoculació, obtenint dades sobre la viabilitat de l'inòcul al llarg del temps (Fig.24)



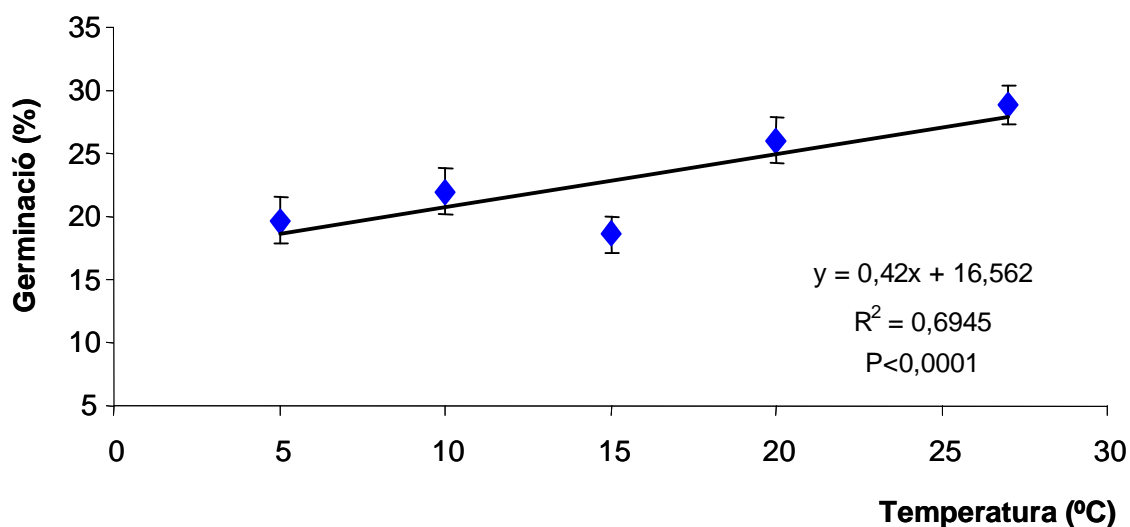
**FIG.24** Efectes del temps en la incidència (fulles amb lesions) i en la severitat (lesions/fulla) de la malaltia en plantes inoculades en el temps 0 (segona repetició).

Per complimentar les dades obtingudes en l'assaig es tenen les dades climàtiques enregistrades pel hobo tan en la primera com en la segona repetició (Annex A).

### 3.2- VIABILITAT EN CONDICIONS CONTROLADES

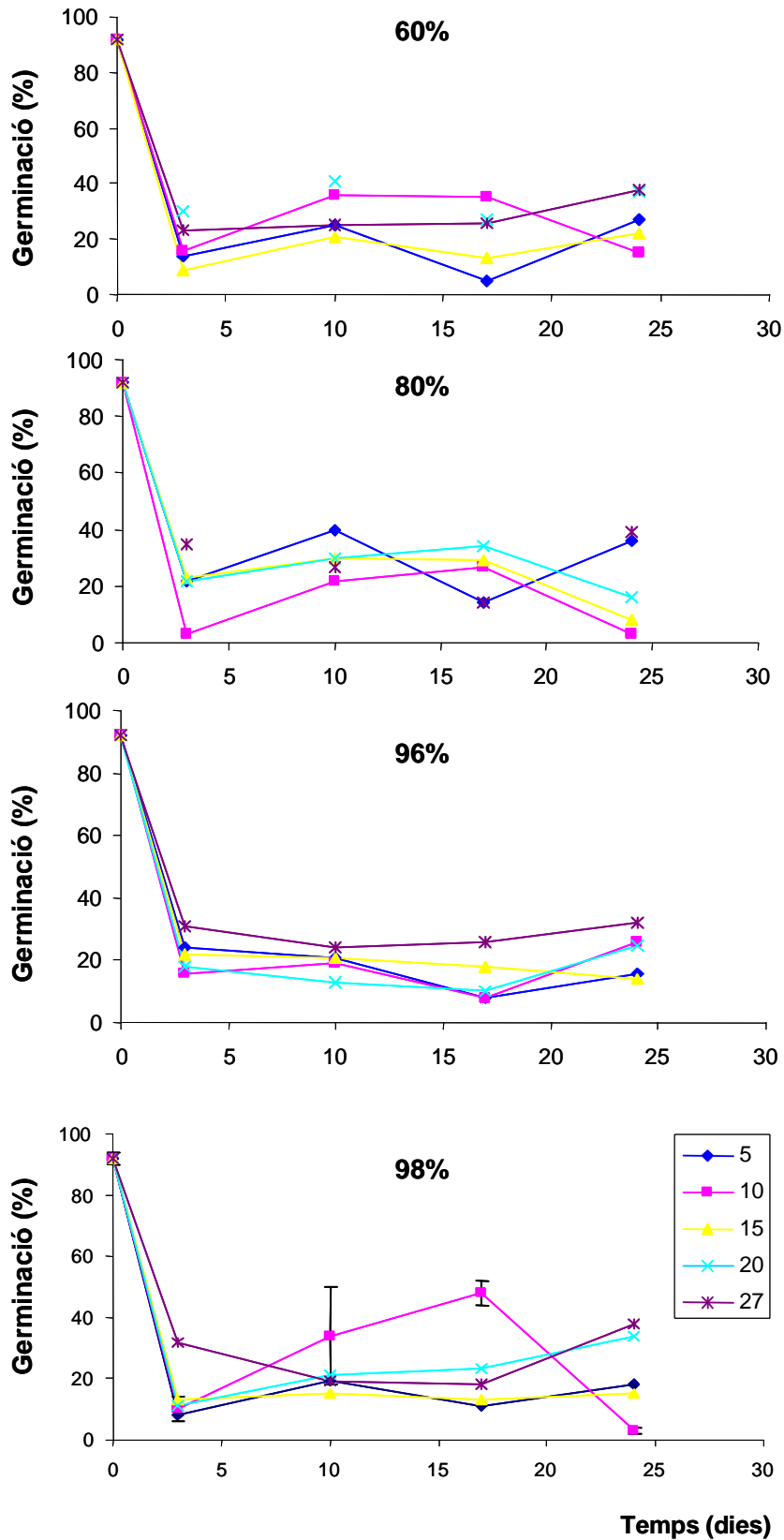
Es va determinar l'efecte del temps, la temperatura i la humitat relativa en la germinació de conidis d'*S.vesicarium* mitjançant una ANOVA, amb tres factors i les respectives interaccions. Es va observar que només era significatiu ( $P < 0,0001$ ) l'efecte de la temperatura (Annex B).

Posteriorment es va determinar que per cada temperatura l'efecte del temps no era significatiu i es van utilitzar totes les dades com a repeticions. Es va determinar l'efecte de la temperatura en la germinació observant que quan més alta era la temperatura més alta era la taxa de germinació dels conidis d'*S.vesicarium* (Fig.25).

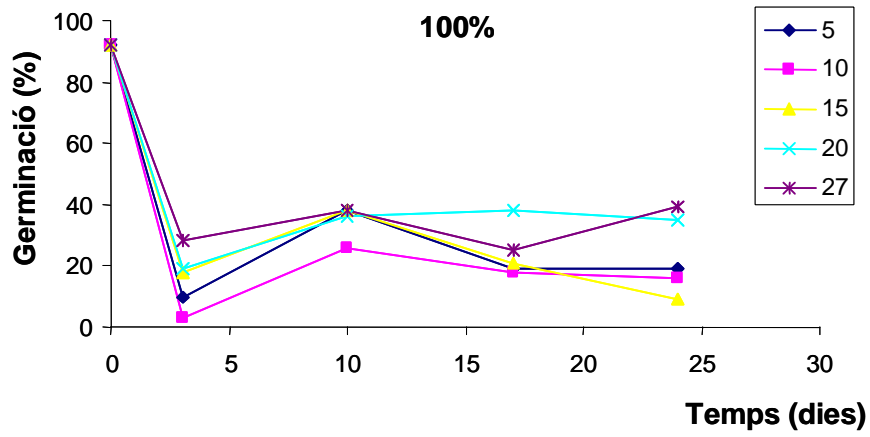


**FIG.25** Efecte de la temperatura en la germinació dels conidis en un període comprès entre 3 i 7 dies.

La germinació dels conidis per les diferents temperatures en funció de cada humitat relativa, es va registrar mitjançant figures on s'observen que en els moments on la germinació dels conidis es més elevada, en general es al cap de 10 dies des de l'inici de l'assaig.



**FIG.26** Efecte de la temperatura (5,10,15,20,27°C) i la humitat relativa (60,80,96,98%) sobre la germinació de conidis d'*S.vesicarium* al llarg del temps.



**FIG.27** Efecte de la temperatura (5,10,15,20,27°C) i la humitat relativa del 100% sobre la germinació de conidis d'*S.vesicarium* al llarg del temps.

# DISCUSSIÓ

En l'assaig finestres en brots els resultats obtinguts mostren que no existeix una forta relació entre la dinàmica d'emissió d'espores i el risc d'infeccions amb els paràmetres climàtics. La falta de relació que s'observa es degut a que l'assaig va haver de finalitzar abans del previst a causa de la ruptura de les bosses.

Els nivells de la malaltia van ser molt baixos en aquest període d'assaig en relació a als assajos realitzats en plantes joves.

En l'assaig finestres en plantes s'observa que la dinàmica d'esperulació té relació amb les incidències de la malaltia i la severitat, es mostra com en alguns moments de predicció de risc d'esperulació coincideixen amb la incidència i la severitat de l'estemfiliosi.

Observant les figures es pot veure com en els moments que s'assoleix el llindar de 0,3 quan es donaria risc d'esperulació es donen resultats prou alts de la presència de la malaltia.

El model Spor està ajustat a un índex d'estacionalitat concret i no està ajustat a la varietat passa crassane que es la que s'ha utilitzat en aquests assaig, és un bon model que conjuntament amb el model Bspcast proporcionen una bona informació per saber els moments d'esperulació i les alliberacions i saber quan es donaran les infeccions. Tenint en compte els dos models ajudarà a predir quan es un bon moment per les aplicacions de fitosanitaris per tal d'evitar infeccions.

En l'assaig de viabilitat de l'inòcul els resultats indiquen que els conidis d'*S.vesicarium* segueixen sent viables al cap de 50 dies. L'inòcul segueix tenint capacitat germinativa i infectiva, per tant són conidis potencialment actius per desenvolupar la malaltia.

El fet que en la segona repetició passats els 15 dies s'observi una davallada de la severitat, es dona pel fet que al cap de 10 dies el nombre de taques necròtiques causades per la malaltia ja era prou significativa, en 5 dies més les taques ja havien ocupat gran part de la superfície foliar per tant es



comptabilitzava tan sols el nombre de taques per fulla per tenir una mesura de la severitat.

S'observa que les dades enregistrades durant la segona repetició de l'assaig a l'hivernacle han estat condicions favorables pel desenvolupament de la malaltia amb valors alts d'humitat relativa entre 70 i 100% i temperatures al voltant dels 12 i els 27 °C,

En l'assaig de viabilitat d'inòcul sota condicions d'humitat i temperatura controlades s'observa que la humitat no afecta significativament a la viabilitat de la germinació dels conidis, fet que es pot explica perquè els conidis adopten formes resistents.

En tres dies baixa dràsticament entre un 60 i un 70 % la capacitat germinativa dels conidis.

La temperatura te efectes significatius sobre la viabilitat dels conidis, a més temperatura més alta ha estat la germinació dels conidis a partir d'aquests 3 dies.

Els paràmetres ambientals com la temperatura, la humitat relativa i la humectació són els 3 paràmetres de més importància per a la viabilitat dels conidis.

# CONCLUSIONS

**1.** El model de previsió de risc Spor es un bon indicador dels moments d'esperulació d'*S.vesicarium* en plantacions de perera. Per tant les perspectives de la utilització d'aquest model en programes de control de la malaltia són bones.

**2.** En l'assaig realitzat en una finca comercial tant les prediccions de risc d'esperulació com la malaltia observada en plantes de perera, indiquen que les primeres emissions es van produir a principis de juny, però les emissions més importants no van ser fins a mitjans de juliol. Això indicaria que durant els mesos d'abril i maig el risc d'inoculació es molt petit i permetria estalviar tractaments fungicides en aquest període.

**3.** La viabilitat dels conidis d'*S.vesicarium* disminueix significativament (60-70%) en tres dies per totes les temperatures (5,10,15,20,27°C) i totes les humitats relatives (60,80,96,98,100%) assajades. De la població de conidis que segueix viable al cap de tres dies l'efecte de la humitat relativa no es significatiu però sí que ho es la temperatura en la capacitat germinativa dels conidis. S'observa un increment del percentatge de germinació amb l'augment de la temperatura. Entre el 10 i el 40% dels conidis tenen capacitat germinativa al cap de 23 dies per totes les condicions assajades.

**4.** La capacitat de produir infeccions per part del fong *S.vesicarium* es com a mínim de 50 dies a partir del moment de la inoculació en plantes mantingudes sota condicions d'hivernacle.

## BIBLIOGRAFIA

- Arnal, J. *Evolució del nombre de pseudotecis del fong Pleospora allii en fulles de perera i influència de la temperatura i el temps en la germinació de les espores en condicions controlades*. Treball Final de Carrera, Girona, Universitat de Girona, 2000.
- Agrios, G. N. *Fitopatología*. Departamento de fitopatología Universidad de Massachusetts. México, 2ª edició, 1999.
- Basallote-Ureba, M.J., Melero-Vara, J.M., Pérez de Algaba, A. and Prados-Ligero, A.M., 1996. Manchas foliares ocasionadas por *Stemphylium vesicarium* en el cultivo del ajo. *Phytoma Spain*. 76:36-39
- Basallote-Ureba, M.J., Prados-Ligero, A.M. and Melero-Vara, J.M., 1998. Effectiveness of tebuconazole and procymidone in the control of *Stemphylium* leaf spots in garlic. *Crop Protection*. Vol. 17.No 6, pp. 491-495.
- Basallote-Ureba, M.J., Prados-Ligero, A.M. and Melero-Vara, J.M., 1999. Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *Plant Pathology*. 48:139-145.
- Batllori, J.L. 1984. Taca negrosa de la perera. *Butlletí de la Cambra Agrària de Girona* núm.25.
- Blancard, D., Allard, E. and Brest, P. 1989. La stemphyliose du porier ou "macules brunes". *Pytoma*. 406:37-38.
- Bonaterra Carreras, A. *Aïllament, caracterització i potencial antagonista de bacteris epífits pel control biològic d'*Stemphylium vesicarium* en perera*. Tesi Doctoral, Girona, Universitat de Girona, 1995.

- Bugiani, R. and Govoni, P., 1991. Aerobiologia e difesa delle piante. *Informatore fitopatologico* 11:9-15.
  
- Bruneli, A., Ponti, I. and Cavanni, P., 1983. Il punto sulla maculatura bruna del pero. *L'Informatore Agrario*. Verona. 2:26421-26425.
  
- Brunelli, A., Rovesti, L., Di Marco, S. and Ponti, I., 1986. Attività di diversi fungicidi contro la maculatura bruna del pero. *Rivista di Frutticoltura*. 1:51-54.
  
- Brunelli, A. 1996. I nuovi prodotti. *Informatore Fitopatologico*. 10:16-18
  
- Canestrone, R., Malvolto, C. and Mazzini, F., 1988. Lotta integrata in Emilia Romagna. *Agricoltura*. Supplemento 3:42-43.
  
- Cavanni, P. and Ponti, I., 1994. Maculatura bruna del pero: micopatia sempre d'attualità. *Rivista di Frutticoltura*. 12:37-42.
  
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press. Florida. APPENDIX A: 313-314. CRC Press, 1987.
  
- De la Cruz, J. I., Martinez, M. A. and Rodriguez Bernabé, J. A. 1997. Incidencia de la plagas y enfermedades en las Comunidades Autónomas durante 1996. *Phytoma*. España 87:28-35.
  
- Fantino, M. G., Ponti, I., Stefanelli, D. and Baldazzi, J. A. 1991. Indagini di laboratorio e di campo per la difesa dell'asparago dalla bruciotura estiva. *Informatore Fitopatologico*. 12:37-41.
  
- Ferrari, M., Marcon, E. and Menta, A. 1996. *Ecologia applicata*. 1. De. Edagricole. Bologna. Italia.
  
- Ferrer, B. *Relació dels factors climàtics en l'alliberació del fong *Stemphylium vesicarium* i el seu teleomorf *Pleospora allii**. Treball Final de Carrera Girona, Universitat de Girona, 2000.

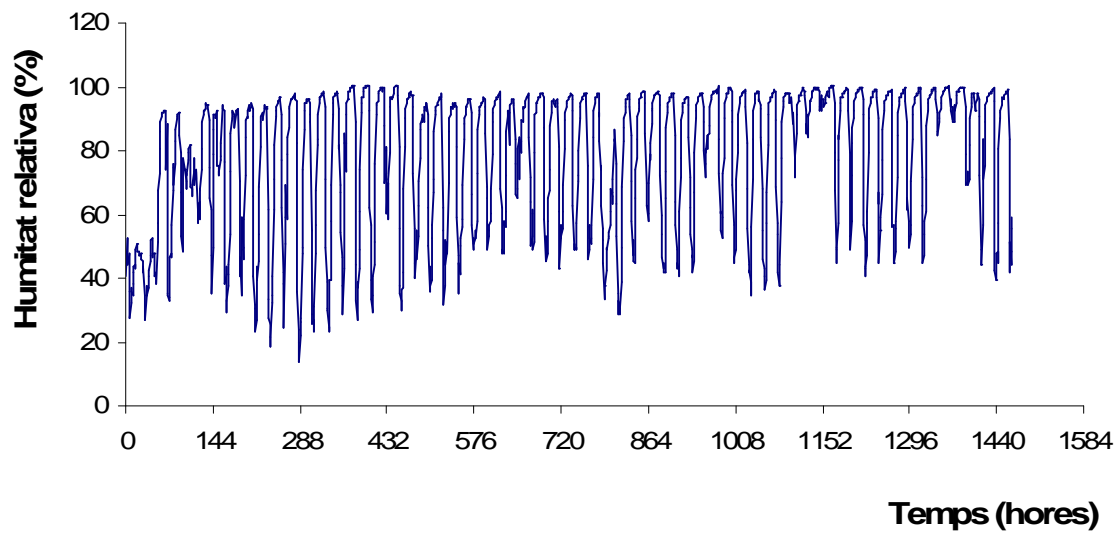
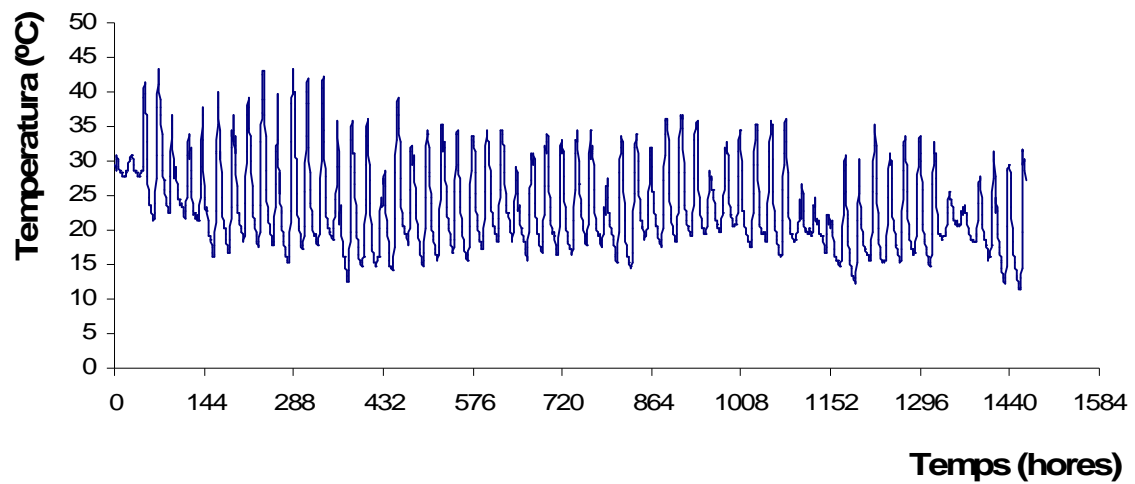
- Hirst, J.M. and Stedman, O. J. 1961. The epidemiology of apple scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. F.) Frequency of airborne spores in orchards. *Ann. Appl. Biol.* 49:290-305.
  
- Isart, C. *Avaluació d'un model per estimar la maduració dels pseudotecis de Pleospora allii en perera*. Treball Final de Carrera Girona, Universitat de Girona, 1999.
  
- Llorente i Cabratosa, I. *Desenvolupament d'un sistema de previsió de risc d'infecció per Stemphylium vesicarium. Avaluació, validació i implementació en parcel·les experimentals en camps comercials de perera*. Tesi doctoral, Girona, Universitat de Girona, 1997.
  
- Llorente, I., Moragrega, C., Vilardell, P. and Montesinos, E. 1999. STREP: a brown-spot disease predictor for scheduling fungicide sprays against *Stemphylium vesicarium* on pear. *Bulletin EPPO* 30: 143-148.
  
- Llorente, I., Vilardell, P., Bugiani, R., Gherardi, I. and Montesinos, E. 2000. Evaluation of BSPcast disease warning system in reduced fungicide use programs for management of brown spot of pear. *Plant Disease* 84:631-637.
  
- MacHardy, W.E. and Gadoury, D.M. 1986. Patterns of ascospore discharge by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 76:985-990.
  
- MacHardy, W E. *Apple scab. Biology, epidemiology and management*. APS Press, 1996
  
- Llorente I. and Montesinos, E., 2002. Effect of Relative Humidity and Interrupted Wetness Periods on Brown Spot Severity of Pear Caused By *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology* 92:99-104.

- Montesinos, E. and Vilardell, P. 1992. Evaluation of fast as a forecasting system for scheduling fungicide sprays for control of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Plant Disease*, 76:1221-1226.
  
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I. and Vilardell, P. 1995a. Susceptibility of selected european pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age. *Plant Disease*, 79:471-473.
  
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P., Bonaterra, A., Ponti, I., Bugiani, R., Cavanni, P. and Brunelli, A. 1995b. Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. *Phytopathology*, 85:586-592.
  
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Ophir, Y. and V.Beer, Steven. 1996. Antagonist of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot pear under controlled environment conditions. *Phytopathology*, 86:856-863.
  
- Montesinos, E., Llorente, I., Moragrega, C., Bonaterra, A., Cervantes, J. and Vilardell, P. 1996. Desarrollo y evaluación a escala productiva de un sistema de control racional de la estemfiliosis (*Stemphylium vesicarium*) del peral. *Fruticultura profesional* 78:96-104.
  
- Palazón, I. J. 1987. Ficha fitosanitaria: Podredumbre negra de la pera {*Stemphylium vesicarium* (Wallr.) Simmons}. *Fruticultura profesional* 10.
  
- Parrón, D. *Avaluació de l'eficàcia de diferents mètodes en la reducció de l'inòcul de Pleospora allii pel control de l'estemfiliosi de la perera*. Treball Final de Carrera, Girona, Universitat de Girona, 2000.
  
- Prados-Ligero, A.M., Melero-Vara, J.M., Corpas-Hervías, C. and Basallote-Ureba, M.J. 2002. Relationships between weather variables, airborne spore concentrations and severity of leaf blight of garlic caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 109:301-310.

- Prados-Ligero, A.M., González-Andújar, J.L., Melero-Vara, J.M. and Basallote-Ureba, M.J. 1998. Development of *Pleospora allii* on garlic debris infected by *Stemphylium vesicarium*. European Journal of Plant Pathology. 104:861-870.
  
- Ponti, I., Cavanni, P. and Brunelli, A. 1982. Maculatura bruna della pera: Etiologia e difesa. L'informatore fitopatologico. 3:35-40.
  
- Ponti, I. and Cavanni, P. 1992. Aerobiology in plant protection. The European Journal of Aerobiology. 8:1:94-101.
  
- Rodriguez, D. *Avaluació de l'eficàcia en el control de l'estemfiliosi de la perera d'aplicacions antifúngiques sistemàtiques i racionals guiades amb el model STREP*. Treball Final de Carrera, Girona, Universitat de Girona, 1998.
  
- Sierra, D. Les acomicètides: loculomicets: Les dotideals. p. 154. A: Folch i Guillèn, R. (Dir.) Tomo V: Fongs i Líquens. Història Natural dels Països Catalans. Enciclopèdia Catalana, 1991.
  
- Sobreiro, J. 1999. El moteado del peral en sistemas de producción integrada. Fruticultura profesional. 100:40-47.
  
- Timoner, I. Guia de productes fitosanitaris. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca. Servei de Protecció Vegetal, 1997.
  
- Trapero, A. 1996. Los hongos fitopatógenos, pp. 713-738. A: Sociedad Española de Fitopatología (Ed.). Tomo II Patología Vegetal. Phytom. España.
  
- Vilardell, P. 1988. *Stemphylium vesicarium* en plantaciones de peral. Fruticultura Profesional. 18:51-55.

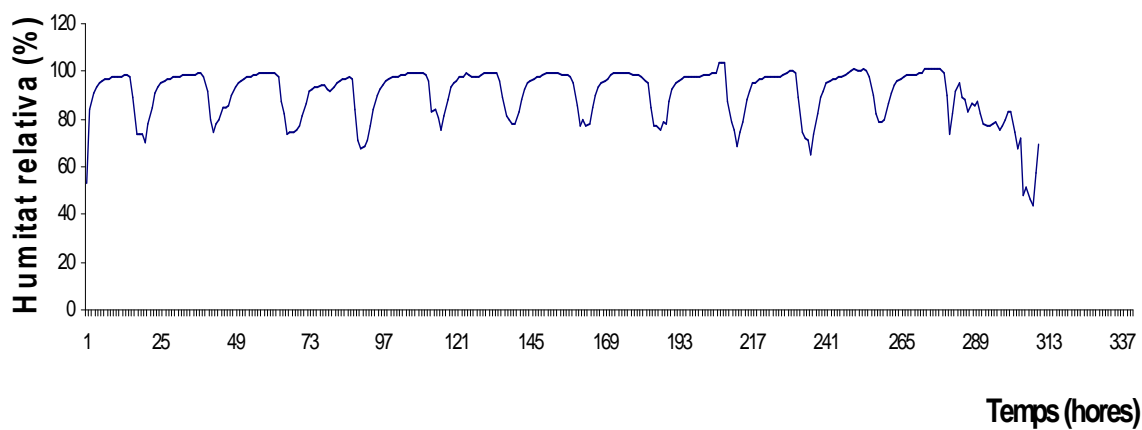
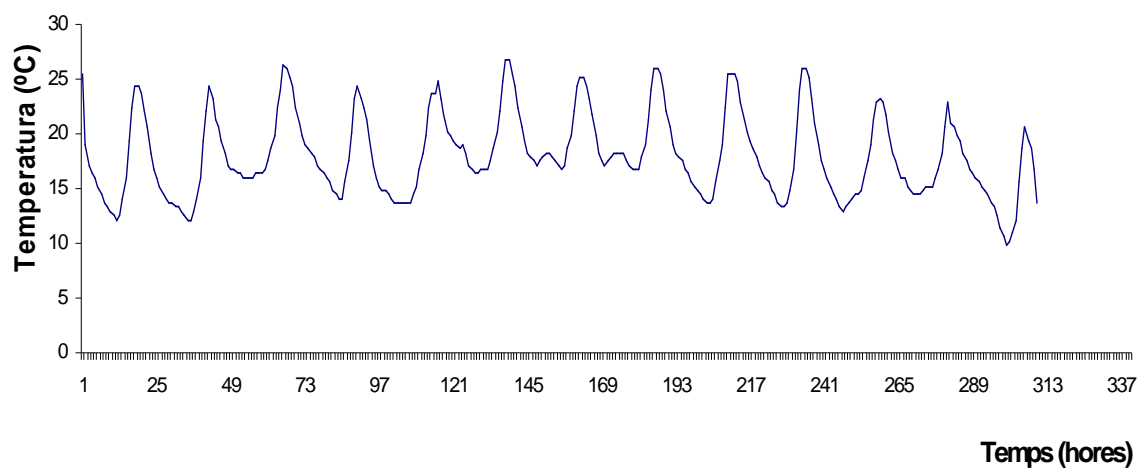
# ANNEXOS

## ANNEX A.



**FIG.1** Temperatura i humitat relativa enregistrades pel hobo emplaçat a l'hivernacle (primera repetició).





**FIG.2** Temperatures i humitats relatives enregistrades pel hobo emplaçat a l'hivernacle (segona repetició).

## ANNEX B.

**Taula 1.** Efectes de la humitat relativa, la temperatura, i el temps en la germinació dels conidis (ANOVA).

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
temps	1	174.72	1.46	0.2290
hr	1	181.10	1.51	0.2207
temp	1	2068.68	17.24	<0.0001
temps*temp	1	85.62	0.71	0.3992
temps*hr	1	6.50	0.05	0.3992
hr*temp	1	8.08	0.07	0.7954
Temps*hr*temp	1	2.27	0.02	0.8906





