

<b>Resum</b> .....	4
<b>Paraules clau</b> .....	6
<b>Agraïments</b> .....	7
<b>1. Introducció</b> .....	8
<b>1.1 La perera</b> .....	8
1.1.1 La planta.....	8
1.1.2 La producció i importància.....	8
<b>1.2 Estemfiliosi en perera</b> .....	9
1.2.1 Agent causant i cicle.....	9
1.2.2 Síntomes.....	10
<b>1.3 Control de la malaltia</b> .....	11
1.3.1 Mètodes i estratègies de control.....	11
1.3.2 Biocontrol de malalties agrícoles.....	13
<b>2.Objectius</b> .....	14
<b>3. Material i mètodes</b> .....	15
<b>3.1 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol mitjançant assajos de sobrecapa</b> .....	15
3.1.1 Producció d'inòcul de <i>S.vesicarium</i> i <i>B.subtilis</i> .....	15
3.1.2 Inoculacions de <i>S.vesicarium</i> i <i>B.subtilis</i> .....	16
3.1.3 Disseny experimental.....	17
3.1.4 Avaluació de la capacitat inhibidora.....	18
<b>3.2 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol en assajos amb restes foliars de perera</b> .....	19
3.2.1 Material vegetal.....	19
3.2.2 Cambra humida.....	20
3.2.3 Producció d'inòcul de <i>S.vesicarium</i> i <i>B.subtilis</i> .....	20
3.2.4 Inoculacions.....	20
3.2.5 Disseny experimental.....	22
3.2.6 Avaluacions.....	22
<b>3.3 Assajos de determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol en fulla de perera viva</b> .....	24

3.3.1 Material vegetal.....	25
3.3.2 Tipus de Cambra humida i incubació.....	25
3.3.3 Producció d'inòcul i inoculacions.....	25
3.3.4 Disseny experimental.....	25
3.3.5 Avaluacions.....	26
<b>3.4 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol</b>	
<b>aplicats en estratègia preventiva.....</b>	<b>27</b>
3.4.1 Material vegetal.....	27
3.4.2 Producció d'inòcul i inoculacions.....	27
3.4.3 Disseny experimental.....	28
3.4.4 Avaluacions.....	29
<b>3.5 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol</b>	
<b>aplicats en estratègia Curativa.....</b>	<b>31</b>
3.5.1 Material vegetal.....	31
3.5.2 Cambra humida.....	31
3.5.3 Producció d'inòcul.....	31
3.5.4 Inoculacions.....	32
3.5.5 Disseny experimental.....	32
3.5.6 Avaluacions.....	33
<b>3.6 Anàlisi estadístic .....</b>	<b>34</b>
<b>4. Resultats.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol</b>	
<b>mitjançant assajos de sobrecapa.....</b>	<b>35</b>
4.1.1 Determinació de l'inhibició del miceli	
en l'assaig de sobrecapa.....	35
<b>4.2 Determinació de l'eficàcia dels agents</b>	
<b>de biocontrol mitjançant assajos amb restes foliars de perera.....</b>	<b>38</b>
4.2.1 Inhibició de miceli.....	38
4.2.2 Determinació del control de l'esperulació.....	42
4.2.3 Determinació de la formació de pseudotecis.....	43
<b>4.3 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol</b>	
<b>en assajos de fulla viva en perera.....</b>	<b>44</b>
4.3.1 Determinació del control de creixement de miceli.....	45

4.3.2 Determinació del control de l' esporulació en l'assaig de fulla viva de perera.....	47
4.3.3 Determinació del control de la formació de pseudotecis en l'assaig de fulla viva de perera.....	49
<b>4.4 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol aplicats de manera curativa.....</b>	<b>51</b>
4.4.1 Determinació del control del creixement de miceli en aplicacions curatives.....	51
4.4.2 Determinació de l' esporulació en l'assaig d'estratègies d'aplicació dels agents de biocontrol de manera curativa.....	56
4.4.3 Determinació del control de la formació de pseudotecis en l'assaig d'estratègies d'aplicació dels agents de biocontrol de manera curativa.....	60
<b>4.5 Determinació de l'eficàcia de control dels agents de biocontrol aplicats de manera preventiva.....</b>	<b>64</b>
4.5.1 Determinació del creixement de miceli en estratègia preventiva.....	64
4.5.2 Determinació de l' esporulació en estratègia preventiva.....	66
4.5.3 Determinació de la formació de pseudotecis en estratègia preventiva.....	67
<b>4.6 Taules resum de resultats.....</b>	<b>69</b>
4.6.1 Taula resum dels resultats de sobrecapa.....	69
4.6.2 Taula resum dels resultats de l'assaig de restes vegetals de perera.....	70
4.6.3 Taula resum dels assajos de fulla viva de perera i d'estratègies.....	71
<b>5. Discussió.....</b>	<b>73</b>
<b>6. Conclusions.....</b>	<b>77</b>
<b>7. Bibliografia.....</b>	<b>79</b>
<b>8. Annexos.....</b>	<b>82</b>

## Resum

---

L'estemfiliosi del la perera és una malaltia fúngica de una gran importància econòmica a la zona del centre i sud d'Europa. Aquesta malaltia és comparable a efecte econòmic al motejat de la pomera, pot arribar a assolir el 90% de pèrdues en pressions elevades de malaltia.

S'ha comprovat que els tractaments amb fungicides presenten una eficàcia de control limitada, i que les mesures sanitàries i de control biològic generen resultats que els plantegen com una eina més a utilitzar en la integració de mètodes de control.

L'objectiu del treball és determinar l'eficàcia de control de *Stemphylium vesicarium* a partir de diferents soques del bacteri *Bacillus subtilis* en assajos en condicions controlades.

Per obtenir els resultats es van plantejar 4 tipus d'assaig.

En els 2 primers assajos es van utilitzar un total de 28 soques d'agent de biocontrol.

En el primer assaig es va avaluar la capacitat d'inhibició de creixement del patogen per part de les soques d'agent de biocontrol, en 2 medis diferents V8 i PDA, i per dues soques de patogen, EPS26 i EPS157.

En el segon assaig es va avaluar la capacitat d'inhibició de miceli, la reducció d' esporulació i formació de pseudotecis en restes de fulles de perera.

Amb les dades dels dos primers assajos i d'altres assajos no presentats en aquest treball es van seleccionar les 8 soques que millor resultat van donar i aquestes es van aplicar en els assajos posteriors.

En el tercer assaig es va avaluar la capacitat d'inhibició de miceli, la reducció d' esporulació i formació de pseudotecis en fulles de perera vives.

En l'últim assaig es van avaluar 2 estratègies de control (curativa i preventiva) en restes vegetals, la primera va tenir com a objectiu avaluar la capacitat d'inhibició del miceli, la reducció d' esporulació i formació de pseudotecis inoculant a discs de fulla morta.

En el primer i segon assaig es van seleccionar les 8 soques que van ser més eficaces. Les soques van ser: A17, A28, A59, A128, A132, A143, A164 i FZB42.

En el tercer assaig es va determinar com en teixit viu hi havia bon efecte de reducció de creixement del miceli, esporulació i formació de pseudotecis. Es va reduir l'esporulació, de mitjana per les soques d'agent de biocontrol, en un 86.8% i la formació de pseudotecis en un 90.65%. També es va reduir el creixement del miceli de manera significativa.

En l'últim assaig, el d'estratègies, l'estratègia d'aplicació d'agents de biocontrol després de l'inici d'infecció va tenir resultats molt variables i com a màxim es va aconseguir reduir l'esporulació en l'aplicació un dia després, en general no hi va haver cap assaig en que més de 3 soques es diferenciessin significativament del control CLB així que la estratègia no va ser gaire efectiva.

En canvi la aplicació anticipada de l'agent de biocontrol en el teixit vegetal va presentar uns resultats homogenis i positius, tant en inhibició de creixement i esporulació com en reducció de formació de pseudotecis. En la inhibició de creixement els resultats van ser els més eficaços, totes les soques van mostrar inhibició en major o menor grau.

## Paraules Clau

---

- Estemfiliosi
- *Pyrus communis*
- *Bacillus subtilis*
- *Stemphylium vesicarium*
- Agent de biocontrol

## Agraïments

---

Aquest treball s'ha elaborat en el marc dels projectes Ministerio de economía y Competitividad, AGL2009-09829/AGR i AGAUR AGE00014 de la Generalitat de Catalunya.

Agrair a l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA) i al departament d'EQATA per el material i les instal·lacions cedides.

També a l'equip humà de Patologia Vegetal del departament, per el seu suport durant tot el procés de laboratori.

A l'Isidre Llorente i la Lidia Ruz per el suport i paciència durant el treball de laboratori i el procés de redacció, han aconseguit que millores molt els meus coneixements en el camp de la patologia vegetal i m'han incentivat a l'aprenentatge durant tot el procés.

Agrair a l'Enric l'assessorament sobre microscòpia en general, i la seva voluntat de compartir el seu treball i coneixement des del primer dia.

A la Mireia, la Gemma i la Nuri que s'han interessat pel meu treball i han mostrat el seu suport i ajut cap a mi, especialment explicant els processos de laboratori i protocols amb molta paciència i bona voluntat.

En general gràcies a tots pel suport rebut.

# 1.Introducció

---

## 1.1 La perera

### 1.1.1 La planta

La perera, *Pyrus comunnis*, pertany a la família de les rosàcies, es un arbre fruiter, caducifoli amb un port que va de 2 a 20 m, de forma erecte i amb un tronc de color marró gris, la seva longevitat arriba als 400 anys, tot i que el més comú són uns 65 anys.

Les fulles son ovalades, de fins a 10 cm de llarg, d'un color verd brillant, que es va intensificant a mesura que passa el temps.

Les flors són blanques o roses i el seu fruit és un pom, anomenat pera.

El clima en que es desenvolupa el cultiu, ha de garantir un mínim fred hivernal, per obtenir una bona floració, amb primaveres sense gelades tardanes i amb estius suaus

L'origen del cultiu de perera, és a dir de la seva domesticació data de 3.000 anys a.C, a Europa oriental i Àsia menor.

### 1.1.2 La producció i importància

Actualment els principals països productors són:

Xina, Itàlia, E.U.A, Espanya, Argentina, Alemanya, Corea, Japó, Turquia, Bèlgica, Holanda, Xile i Sud africà i Àustria. La major productivitat la obté Àustria amb 44Tn/ha i la major producció és de la Xina amb 11.9 milions de tones l'any 2005.



Les varietats cultivades a Catalunya són: Conference, Blanquilla, Passe-cressane, General Leclerc, Abate-Fété́l, Llimonera, Ercolini, Williams, Red barlett, Comtesa o Alexandrine, Doyenne du comice, Flor d'hivern, Castells.

Girona és una zona amb una producció important (9.022 t, any 2011), tot i així, la província de Lleida té una major producció ( 253.238 t, any 2011).

**Taula 1.** Distribució de la superfície cultivada (ha), rendiment (%) i producció (t); per grups varietals de perera a la zona fructícola de Girona (2001-02 i 1995), (gencat.cat 2012)

Grup de Varietats	Campanya 2011		
	Superfície Productiva (ha) <sup>(1)</sup>	Rendiment (kg/ha) <sup>(2)</sup>	Previsió de producció 2011 (t)
Passacrassana	33	35.870	1.190
Conference	134	31.194	4.182
Decana de Comice	31	15.625	491
General Leclerc	39	17.757	696
Altres de tardor	152	16.237	2.463
<b>Total Girona</b>	<b>390</b>		<b>9.022</b>

## 1.2 Estemfiliosi en perera

### 1.2.1 Agent causant i cicle

Aquesta malaltia va ser detectada per primer cop el 1975 a la regió italiana de la Emilia-Romagna en la varietat abate-fété́l, a Catalunya es va detectar per primera vegada al 1984 en Passe-Cressane i Conference.

És una malaltia de gran importància econòmica, que pot generar unes pèrdues de producció entre l'1 i el 10% (Montesinos i Vilardell 1992).

La aparició d'aquesta malaltia a Europa, és un risc de pèrdua de producció tant per als països del centre com Bèlgica o Holanda, com per als països del sud, Espanya i Portugal (Deckers et al. 2005).

L'estemfiliosi de la perera, es causada per un fong deuteromicet anomenat *Stemphylium vesicarium* (Anamorf) , en la fase sexual rep el nom de: *Pleospora allii* (Teleomorf).

L'anamorf es caracteritza per uns conidis foscos, ovalats, pluricel·lulars i entre 1 i 5 septes transversals i entre 1 i 2 septes longitudinals, aquests conidis tenen mida variable però es troben en un rang comprès entre 21 i 48 µm de llargada i entre 11 i 22 µm d'amplada.

El teleomorf produeix pseudotecis durant la fase sexual, de color marró fosc i amb forma circular, amb un radi d'entre 100-500 µm. Les asques dels pseudotecis contenen 8 ascospores de color groc marronós, de forma el·lipsoïdal, tenen entre 3 i 7 septes transversals i 1 de longitudinal.

Pel que fa al cicle, es caracteritza per tenir dues fases com s'ha citat anteriorment, la fase sexual i la asexual. La fase asexual és la que va en sincronia amb la planta durant l'estadi vegetatiu, durant la primavera – estiu.

La fase sexual es dona a la tardor, amb la formació de pseudotecis en les restes de material mort prèviament infectat. El desenvolupament dels pseudotecis requereix força humitat, >98% i un òptim de temperatures entre 10 i 15 °C.

Generalment la emissió d'ascospores pot començar al desembre, però el més comú és de mig gener fins a finals d'abril ( Llorente i Montesinos 2006 ).

### **1.2.2 Síntomes**

Són taques negres necròtiques en fruits, fulles, pecíols i tiges. Els primers símptomes en fruits es poden veure a finals de maig, però és més comú identificar-los durant el juny. Inicialment en fruits joves les taques són circulars, de color marró, de 1 a 2 mm de diàmetre i a vegades amb un halos vermell al voltant. Mes endavant, en fruits madurs, les taques arriben a un diàmetre de 10 a 20 mm i la part interior es pot podrir si es colonitzada per fongs com *Alternaria spp.* ( Llorente i Montesinos 2006 )

Un atac greu pot provocar la defoliació total de la planta i una forta pèrdua de producció (Llorente et al. 2000).

## 1.3 Control de la malaltia

### 1.3.1 Mètodes i estratègies de control

Hi ha diferents estratègies i mètodes de control de la malaltia.

Els més utilitzats són mètodes químics que es basen en protegir l'hoste de l'inòcul del patogen mitjançant compostos químics tòxics pel patogen .

Les matèries actives utilitzables per al control en producció integrada de la malaltia en perera són: Boscalida + Piraclostrobin, Captan, Ciprodinil + fludioxonil, Kresoxim-metil, Tebuconazol i Trifloxistrobin (producció integrada 08/2012).

La majoria de productes fitosanitaris tenen un període de manteniment de la eficàcia que està entre 7 i 14 dies, tradicionalment per assegurar la producció s'opta per tractar tant bon punt acaba aquest període, aquest tipus de metodologia d'aplicació s'anomena aplicació amb cadència fixa. Tot i així aquest mètode presenta certs inconvenients, i és que s'aplica una quantitat molt gran de productes que comporten un cost econòmic, mediambiental i de disminució de la qualitat de la producció per presència de residus.

També cal dir que una part de tractaments que es fan en condicions ambientals poc favorable per l'inici d'infeccions, són innecessaris (Llorente et al. 2010).

Una millora de les mesures de control químic és el mètode de programació de tractaments mitjançant models de predicció del risc d'infecció, en aquest cas el BSPCast. La diferència d'estalvi de tractaments, tractant amb cadència fixa o bé utilitzant el model de risc d'infecció BSPCast, és de entre el 20 - 70% per productes amb una període de durada de 15 dies o bé de un 20 - 50% per productes amb una període de 7 dies tot i tenir el mateix control (Llorente et al. 2000).

L'aplicació de fungicides durant el període de vegetació de la perera és la principal estratègia de control, però l'eficàcia dels fungicides, tant utilitzats amb cadència fixe com amb el sistema BSPcast tenen un efecte baix quan la pressió de malaltia és gran, quan hi ha molta pressió d'inòcul, quan les condicions ambientals són favorables o quan es treballa amb varietats molt susceptibles de perera.

Tot i així els tractaments químics s'ha vist que tenen certes limitacions.

Per reduir la pressió de la malaltia, a més a més del control químic es poden utilitzar mesures per disminuir l'inòcul.

L'aplicació de derivats de coures durant la tardor i l'hivern, no redueix la capacitat de producció d'ascospores de *P.alli* (Llorente et al. 2006).

La complexitat de la malaltia és un factor a tenir en compte, *S. vesicarium*, es pot desenvolupar de manera sapròfita també en restes vegetals.

La producció d'inòcul del fong es localitza a les restes vegetals presents en el sòl de les plantacions (Llorente et al. 2011).

L'eliminació de restes vegetals, per evitar que sigui font d'inòcul, és una mesura sanitària molt important, això té afecte especialment en el cicle primari del patogen.

Els mètodes de control sanitaris, consisteixen en una combinació de eliminació de restes vegetals durant l'hivern a les plantacions afectades i tractaments amb agents de biocontrol a final d'hivern i a la primavera (Llorente et al. 2011).

Una mesura d'exclusió del patogen, és la cobertura del sòl mitjançant plàstic, això provoca una reducció de la pressió d'inòcul en l'aire (de Jong et al. 2007).

Les mesures de control biològic són una eina més en el control integrat, aquestes tenen com a objectiu la millora de la resistència de l'hoste o bé afavorir microorganismes antagonistes.

Tractaments mitjançant *Trichoderma*, són una mesura de control biològic eficaç, actualment el biocontrol en *S. vesicarium* es basa en aplicacions de *Trichoderma*. Tractaments amb *Trichoderma* arriben a reduir fins a un 50% la producció d'inòcul d'*S. vesicarium* en assajos a camp (Rossi et al 2009).

Vist l'estancament del control químic i la aparició de resistències, fan que els mètodes sanitaris i el control biològic esdevinguin eines a desenvolupar en l'agricultura del s.XXI, justament en aquest treball s'aprofundirà en el camp dels agents de biocontrol.

### **1.3.2 Biocontrol de malalties agrícoles**

Durant el s. XX la agricultura ha fet ús de diferents instruments per tal de millorar les produccions agrícoles, adobs químics i pesticides bàsicament; tot això ha comportat una augment de la productivitat agrària però el mal ús d'aquests ha generat problemes de contaminació amb una conseqüent mala imatge de la societat vers d'aquests. Amb tot això s'inicia una etapa on la tècnica agrària pren molta importància ja que s'entra en una situació de restricció i/o prohibició de pesticides de tot tipus, especialment a nivell Europeu. Així doncs els mètodes de control basats en control biològic i el maneig estan més que justificats com a necessaris.

En general el biocontrol es basa en la interacció entre microorganismes, aquesta pot ser: Mutualisme, protooperació, comensalisme, neutralisme, competència, amensalisme, parasitisme i predació.

El biocontrol basat en interacció de tipus competència, es basa en la competència pels micronutrients, com ara el ferro o mitjançant la colonització de la rizosfera mitjançant microbiota no patogènica i fent que competeixi amb la que genera malaltia.

Un altre mètode de control biològic és el que utilitza la inducció de les defenses de l'hoste activant-les de manera intencionada.

Un exemple de parasitisme i predació, són algunes espècies de *Trichoderma* que produeixen certs grups d'enzims que degraden la paret cel·lular dels fongs (Pal and McSpadden, 2006).

Alguns agents de biocontrol tenen el problema de la baixa persistència sota condicions ambiental naturals.

Els bacteris del gènere *Bacillus* estan considerats com a microorganismes segurs i amb una gran capacitat de sintetitzar una gran varietat de substàncies interessants per l'agricultura i la indústria (Stein 2005).

## 2. Objectius

---

L'Objectiu del treball és seleccionar les soques de *Bacillus subtilis* que siguin eficaces en el control de la producció d'inòcul *Stemphylium vesicarium*.

Els objectius parcials són:

- Determinar la capacitat de diferents soques de *B. subtilis* d'inhibició del creixement de *S. vesicarium*.
- Avaluar la reducció de producció d'inòcul, tant conidis com pseudotecis d'*S. vesicarium*, de les diferents soques utilitzades.
- Determinar l'estratègia òptima per l'aplicació dels agents de biocontrol.

## 3. Material i mètodes

---

### 3.1 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol mitjançant assajos de sobrecapa

L'objectiu de l'assaig, va ser avaluar la capacitat d'inhibició de creixement i esporulació d'*Stemphylium vesicarium* per part de les diferents soques de l'agent de biocontrol.

També es pretenia obtenir a partir de les dades obtingudes, un criteri de valoració per elaborar una selecció de les soques de *Bacillus subtilis* que millor resultats presentessin.

Aquest tipus d'assajos es van fer *in vitro*.

Les soques d'agent de biocontrol i de patogen utilitzades provenien de la col·lecció de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària.

Les soques de *S. vesicarium* utilitzades en aquest assaig van ser la EPS26 i la EPS157, i pel que fa a *B. subtilis* es van utilitzar: A1, A5, A17, A28, A55, A56, A59, A69, A80, A84, A85, A87, A89, A90, A91, A92, A94, A95, A97, A100, A128, A132, A143, A151, A164, A180, FZB42 i QST713.

#### 3.1.1 Producció d'inòcul de *S. vesicarium* i *B. subtilis*

Per a la producció de cultius del patogen, es va repicar la soca EPS26 d'*S. vesicarium* en plaques petri amb medi V8 modificat (10g de concentrat de tomaca, 2.3 g de CaCO<sub>3</sub>, 12.8 g d'agar i 800 ml d'aigua destil·lada i posteriorment autoclavat). Aquestes plaques es mantenien durant 10 dies a 22.5° i a 16h de llum en un incubador de fongs (I-30BLL Percival plant biology Chamber, Percival Scientific Inc., USA).

Per a l'obtenció d'inòcul del patogen es van utilitzar colònies crescudes durant 10 dies, on es van abocar 2 tubs de 4.5 ml d'aigua destil·lada estèril per placa, llavors es va passar una nansa de Digrafsky per la superfície. Es va filtrar la suspensió amb un tamís de 0.2 mm esterilitzat i posteriorment es va abocar en un tub de 30 ml . D'aquesta manera es va obtenir una suspensió només amb conidis.

Un cop elaborada la suspensió, es va mantenir a temperatura baixa mitjançant gel o bé la nevera per evitar la germinació dels conidis.

Per assegurar una correcta concentració de conidis, de cada suspensió es recomptaven a una lupa (NIKKON SMZ 1500) 3 mostres de 10 µl, per tal d'ajustar-les sempre a  $1-6 \times 10^4$  conidis/ml.

Pel que fa als *B. subtilis*, l'agent de biocontrol, es va utilitzar un cultiu de 24h d'incubació a 22.5º preparat el dia anterior, per obtenir-lo es va descongelar la col·lecció de soques de *B. subtilis* de l'INTEA, es van sembrar en plaques de LB i es va incubar a 22.5º.

### **3.1.2 Inoculacions de *S. vesicarium* i *B. subtilis***

Previ a les inoculacions es van preparar plaques de medi PDA ( 60 plaques ) i medi V8 modificat ( 60 plaques) per realitzar l'assaig.

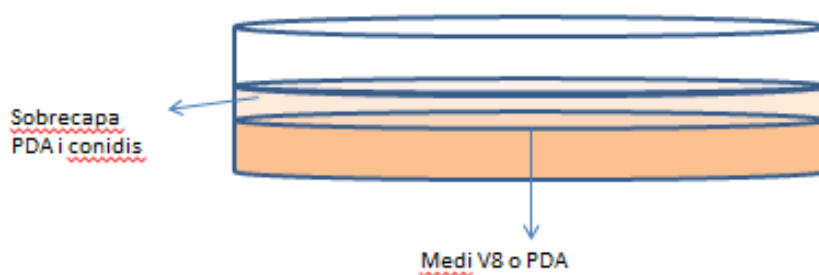
La inoculació es va fer mitjançant una sobrecapa d'agar fos. Es va preparar medi PDA (200 ml d'aigua destil·lada i 3g d'agar i es va autoclavar), un cop fos, es va dispensar en tubs de vidre roscats, a raó de 3,5 ml per tub. Cada tub es va utilitzar per inocular en 1 placa de medi.

Donat que el medi quedava molt solidificat en el moment de fer l'assaig es fonia mitjançant un microones. Un cop fos el medi s'afegien 100 µl de la suspensió d'*S. vesicarium* a una concentració de  $1 \text{ a } 9 \times 10^4$  conidis/ml i ràpidament s'abocaven a les plaques amb medi V8 o PDA preparades anteriorment, fins a obtenir una capa homogènia (figura 1).



Per la inoculació dels *B. subtilis* es va utilitzar un cultiu de 24h d'incubació preparat el dia anterior (apartat 2.1.1), que es va sembrar mitjançant escuradents estèrils a sobre la capa d'agar un cop refredada. La sembra es va portar a terme punxant suaument les colònies de *B. subtilis* i després es va fer el mateix en la placa de la sobrecapa, deixant així una fracció de bacteris.

La concentració de *B. subtilis* aplicada va ser de  $1-9 \times 10^9$  c.f.u/ml.



**Figura 1.** Esquema de una placa de l'assaig de sobrecapa.

### 3.1.3 Disseny experimental

L'assaig es va portar a terme amb medi V8 amb la soca d'*S. vesicarium* EPS157, medi PDA amb la soca d'*S. vesicarium* EPS157 i medi PDA amb la soca d'*S. vesicarium* amb EPS26.

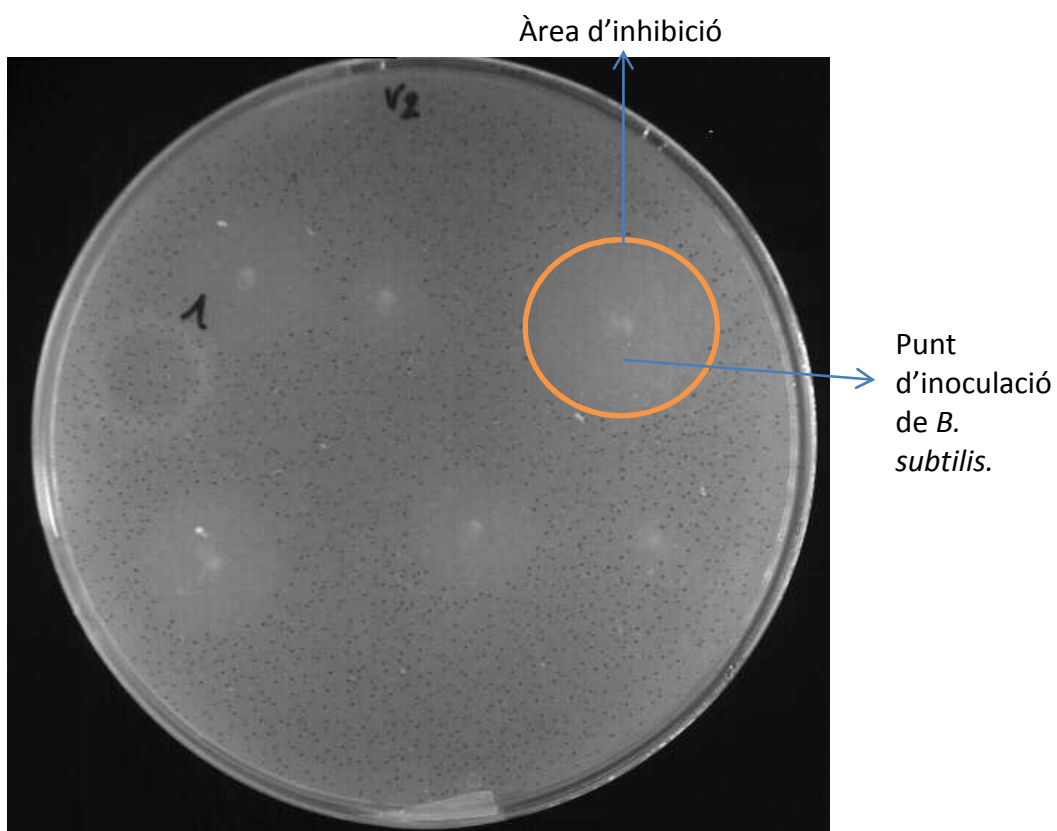
Per cada medi es van inocular les 28 soques d'agent de biocontrol.

A cada placa es van sembrar 6 soques diferents d'agent de biocontrol, es van fer 3 repeticions, amb 1 placa/repetició, així que cada soca es va repetir 3 vegades.

Per tant per cada medi i soca d'*S. vesicarium* es van utilitzar 15 plaques. En tot l'assaig es van utilitzar 45 plaques.

### 3.1.4 Avaluació de la capacitat inhibidora

Les lectures es van portar a terme a 1,4,7 i 11 dies de la inoculació avaluant el diàmetre de l'halo que generava la inhibició del fong per part de l'agent de biocontrol (figura 2).



**Figura 2.** Placa d'un assaig de sobrecapa, on s'aprecien els 6 tractaments i els halos que generen alguns d'ells.

## **3.2 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol en assajos amb restes foliars de perera**

Els objectius de l'assaig van ser avaluar la capacitat d'inhibició de l' esporulació i la formació de pseudotecis de *S. vesicarium* per part de les diferents soques de l'agent de biocontrol sobre restes foliars.

També es va utilitzar, com en el cas anterior, per obtenir un criteri de selecció de les soques de *B. subtilis*.

Es van utilitzar totes les soques de *B. subtilis*: A1, A5, A17, A28, A55, A56, A59, A69, A80, A84, A85, A87, A89, A90, A91, A92, A94, A95, A97, A100, A128, A132, A143, A151, A164, A180, FZB42 i QST713.

La soca de patògen utilitzada va ser la EPS26 únicament.

### **3.2.1 Material vegetal**

En assajos amb restes vegetals es van utilitzar fulles vives autoclavades (mort provocada) i fulles mortes de la caiguda de la tardor, que també es van autoclavar per aconseguir condicions d'esterilitat. Posteriorment el material es va guardar a la nevera en safates segellades per esperar l'assaig.

El fet de utilitzar material provinent de diferents formes, es va deure a que el procés de laboratori va ser llarg i el tipus material vegetal va variant conforme el cicle del cultiu.

Les fulles utilitzades eren de perera, de la varietat conference i procedents d'una finca experimental de la Universitat de Girona. En l'assaig es van utilitzar 420 fulles.

### **3.2.2 Cambra humida**

Per a la correcta incubació es va utilitzar una safata en forma de calaix, de material plàstic i amb bona transparència, i per tal de segellar-lo es va cobrir amb una bossa transparent. Abans de les inoculacions, es va humitejar el paper situat al fons de les cambres, de manera que quedés saturat però sense aigua lliure, de manera que es va obtenir una humitat relativa alta, creant condicions favorables a l'esperulació.

### **3.2.3 Producció d'inòcul de *S. vesicarium* i *B. subtilis***

Per la producció d'inòcul del patogen es va utilitzar el mateix procés que en l'assaig de sobrecapa (apartat 3.1.1).

Per la producció de colònies fresques d'agent de biocontrol es va utilitzar també el mateix procés que en l'assaig de sobrecapa (apartat 3.1.1) que es van utilitzar seguidament.

Com que la aplicació de l'agent de biocontrol es va fer mitjançant una pipeta, es va requerir cultiu líquid.

Per obtenir-lo, es van utilitzar els cultius frescos de *B. subtilis*, i es va sembrar cada soca en un tub amb 20 ml de LB líquid estèril. Un cop sembrat es va incubar a 23<sup>o</sup> a l'agitador orbital (INNOVA 4335, NEW BRUNSWICK Scientific Co., INC USA). La concentració objectiu va ser de  $1-9 \times 10^9$  c.f.u/ml.

### **3.2.4 Inoculacions**

En primer lloc, es van abocar les soques de *B. subtilis* una per una en plaques petri estèrils, després es van submergir 7 fulles durant 5 segons per cada placa.

Un cop banyades es van col·locar les 7 fulles del mateix tractament en línia a la safata utilitzada com a cambra humida. A cada safata es van col·locar 28 fulles, és a dir 4

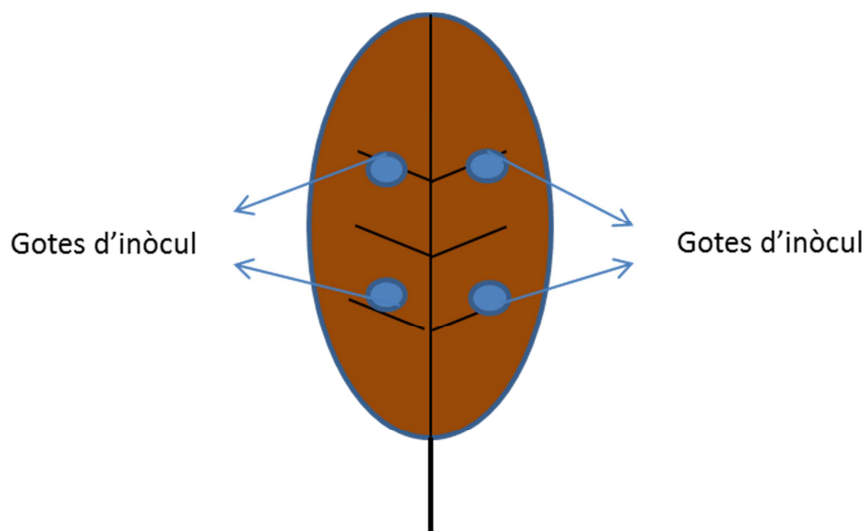
soques d'agent de biocontrol. Per finalitzar es va deixar assecat a la campana de flux laminar.

Paral·lelament al procés, per comprovar la correcta concentració de la suspensió de *B. subtilis* es va portar a terme un banc de dilucions de 2 soques triades aleatòriament.

Un cop elaborades les dilucions es va sembrar en plaques de PDA, 1 per cada soca, la sembra es va fer mitjançant gotes de 20µl, es van sembrar gotes de les dilucions -3,-4 i -5 amb 2 repeticions de cada.

El dia següent es recomptaven les colònies per assegurar que es treballava a una concentració de  $1-9 \times 10^9$  c.f.u/ml .

Un cop sec, es va inocular el patogen mitjançant 4 gotes de 20 µl de la suspensió per cada fulla (figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la inoculació de *S. vesicarium* en fulles de l'assaig de restes vegetals.

Aquest procés es va repetir en les 210 fulles, i un cop acabat es va deixar assecat 30 minuts abans de segellar les safates.

Tant l'aplicació d'agent de biocontrol, com de patogen, es van fer sempre en el revers de la fulla.

### 3.2.5 Disseny experimental

Es va utilitzar una soca de patogen (EPS26), i de *B. subtilis* es van utilitzar totes les soques i 2 controls, un amb aigua i l'altre amb LB líquid.

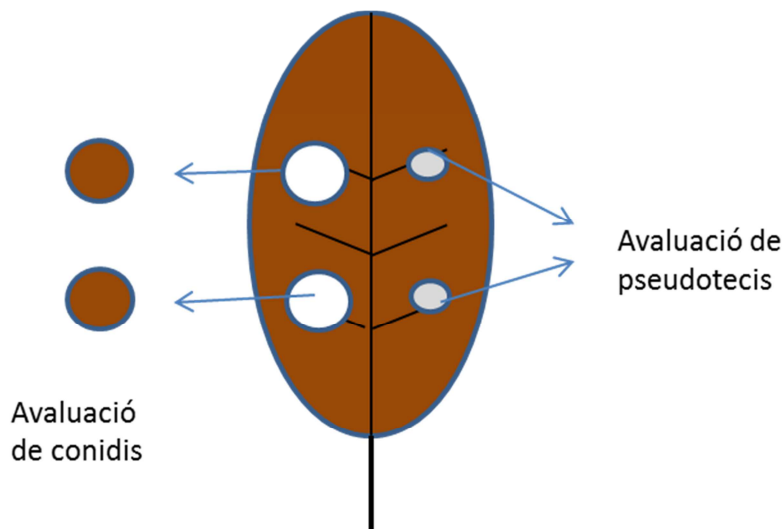
Es va aplicar cada soca de *B. subtilis* en 7 fulles diferents, cada fulla es disposaven 4 gotes d'inòcul de patogen. En total es van utilitzar 7 fulles de cada repetició i es van fer 2 repeticions de l'assaig.

En total es van utilitzar 420 fulles.

### 3.2.6 Avaluacions

Les lectures es van realitzar a terme als 1,4,7 i 11 dies posteriors a la inoculació. S'avaluava el diàmetre ocupat per el miceli en cada un dels 4 punts d'inoculació amb una escala del 0 al 4 ( 0: 0mm; 1: 0-2.5mm; 2: 2.5-5mm; 3: 5-10mm; 4: >10mm )

Passat 10 dies es van treure 2 discs per fulla d'1cm de diàmetre mitjançant un trepant per tal d'avaluar el nivell d'esperulació (figura 4).



**Figura 4.** Esquema del procés de avaluació de cada fulla passats els 10 dies de la inoculació.

Un cop extrets es van col·locar en tubs de 30 ml autoclavables en una solució de 40µl de Blau de Lactofenol per fixar les mostres i 4 ml d'aigua destil·lada i tot prèviament esterilitzat abans de afegir el disc.

Després els tubs es trituraven en el politron (PT MR 3000 KINEMATICA AG, Suècia) per obtenir una barreja homogènia i dispersar els conidis en la solució per ser comptats.

Posteriorment es va avaluar una fracció de 10 µl per repetició i mitjançant la lupa a 110 augments.

Amb aquest procés es va determinar el nº de conidis.

En el moment en que es van retirar els discs, les fulles es van tornar a la cambra i es va tornar a segellar i es va posar 10 dies més a un incubador a 14 ° i absència de llum per tal de que es produïssin pseudotecis (figura 6).

Un cop passats 10 dies a l'incubador, es van comptar els pseudotecis de una zona corresponent a 1cm de diàmetre de la inoculació d'*S. vesicarium* mitjançant una lupa (figura 5).



Figura 5. Procés de recompte de pseudotecis en un assaig de fulla viva.

### 3.3 Assajos de determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol en fulla de perera viva

Els objectius de l'assaig, van ser avaluar la capacitat d'inhibició de l'esperulació i de formació de pseudotecis d'*S. vesicarium* per part de les soques d'agent de biocontrol utilitzades en fulles de perera vives.

En aquest assaig es va utilitzar una selecció de soques de *B. subtilis*, elaborada en base a les dades obtingudes en els 2 assajos anteriors i que havien mostrat una eficàcia major.

Les soques de *B. subtilis* utilitzades van ser: A17,A28,A59,A128,A132,A143,A164,FZB42

Com a patògen es va utilitzar la soca EPS26.



### **3.3.1 Material vegetal**

Es van utilitzar fulles verdes de perera, de la varietat conference i procedents d'una finca experimental de la Universitat de Girona.

### **3.3.2 Tipus de cambra humida i incubació**

Es va utilitzar la mateixa cambra que en l'assaig de restes foliars de perera (apartat 3.2.2).

### **3.3.3 Producció d'inòcul i inoculacions**

El disseny experimental va ser el mateix que en l'assaig de restes vegetals, el procediment d'obtenció d'inòcul i inoculació de *S. vesicarium* també va ser igual (apartat 3.2.3 i 3.2.4).

L'obtenció de suspensions de *B. subtilis* i la seva aplicació en les fulles es va fer mitjançant el mateix procediment que en l'assaig de restes vegetals (apartat 3.2.3 i 3.2.4).

### **3.3.4 Disseny experimental**

Es van utilitzar 8 soques de *B. subtilis* i 2 controls, els control amb aigua i el control amb LB líquid.

A cada repetició es van tractar 7 fulles amb la mateixa soca d'agent de biocontrol, a cada fulla se li va inocular el patogen en 4 punts ( Figura 3), en general cada cambra va contenir 3 - 4 tractaments diferents (de 21 a 28 fulles).

L'assaig es va compondre de 70 fulles ( $\frac{7 \text{ fulles}}{\text{soca}} \times 8 \text{ soques} + \frac{7 \text{ fulles}}{\text{control}} \times 2 \text{ controls}$ ), i en total es van fer 2 repeticions de l'assaig, així que es van utilitzar 140 fulles.

### 3.3.5 Avaluacions

Els mètodes d'avaluació van ser els mateixos que en l'assaig anterior (vegeu 2.2.6).



**Figura 6.** Procés d'extracció de discs per al recompte de conidis.

### **3.4 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol aplicats en estratègia preventiva.**

Els objectius de l'assaig van ser avaluar la capacitat d'inhibició del miceli, la capacitat de reducció d'esperulació i la disminució de formació de pseudotecis en una situació en que el *S. vesicarium* comença a interaccionar amb l'agent de biocontrol quan la colònia de fong té 5 dies. Encara que hagués pogut semblar que era una estratègia curativa, calia entendre que en el moment de l'aplicació de l'agent de biocontrol, el material era sa, per tant, no es pretenia reduir la infecció, sinó prevenir-la.

Es va utilitzar la soca EPS26 del patogen, i pel que fa als *B. subtilis* es van utilitzar les soques A17,A28,A59,A128,A132,A143,A164,FZB42.

#### **3.4.1 Material vegetal**

La varietat utilitzada va ser la conference provinent d'una finca experimental de la Universitat de Girona.

En aquest assaig es van utilitzar discs de fulla morta, ja sigui provinents de fulles vives autoclavades o fulles de caiguda de tardor. Els discs tenien un diàmetre d'1 cm i abans d'utilitzar-los es van esterilitzar mitjançant l'autoclau. En total es van preparar 200 discs de fulla.

#### **3.4.2 Producció d'inòcul i inoculacions**

En primer lloc es va repicar el patogen mitjançant un fragment de colònia en una placa de medi V8 modificat. Un cop repicat es va posar a l'incubador de fongs a 22.5º i 16h de llum durant 5 dies.

Passats 5 dies es va realitzar l'assaig, es van agafar els tubs amb 20 ml de suspensió d'agent de biocontrol preparats com en l'assaig de restes vegetals (apartat 2.2.3) i es va abocar cada soca de *B. subtilis* a una placa petri buida diferent (figura 7).

Un cop fet, es va procedir a agafar grups de discs de fulla de 5 en 5 i es van submergir en la suspensió de bacteris durant 10 segons. Un cop tractats els discs, es van col·locar a les plaques de medi V8 modificat amb la colònia de *S. vesicarium* de 5 dies, de manera que quedessin situats al voltant de la colònia i equidistants entre ells (figura 8).

En total, a cada placa hi havia 5 discs amb la mateixa soca i es van realitzar 2 plaques per soca.

### **3.4.3 Disseny experimental**

Es van utilitzar 8 soques de *B. subtilis* i 2 control, un tractat amb aigua i l'altre amb LB líquid. La soca de patogen que es va inocular va ser la EPS26.

L'assaig es va realitzar en plaques, a cada placa hi havia una colònia on es van col·locar 5 discs de fulla al voltant amb el mateix tractament d'agent de biocontrol, per cada soca es van realitzar 2 repeticions.

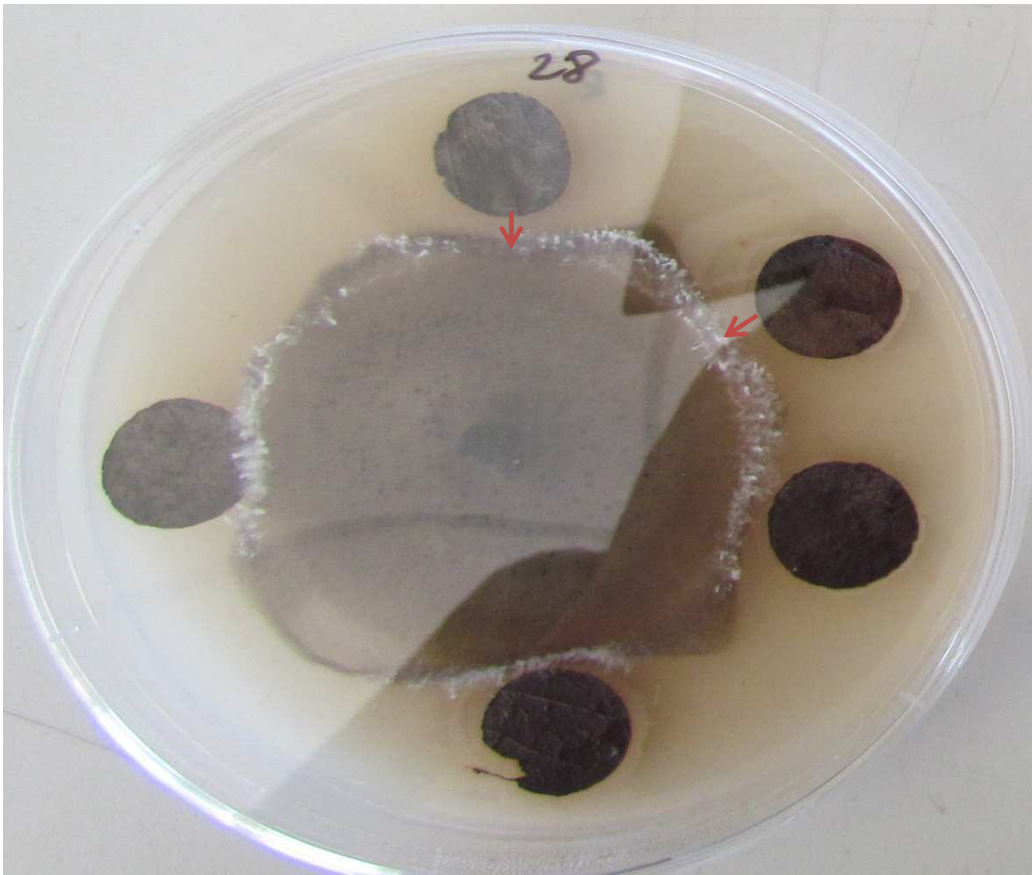
En total l'assaig es va repetir 2 vegades i es van utilitzar 40 plaques.



**Figura 7.** Procés d'inoculació dels *B. subtilis* mitjançant el bany del material vegetal.

#### **3.4.4 Avaluacions**

Es van portar a terme lectures de creixement de miceli als 1,4,7 i 11 dies després de la inoculació dels *B. subtilis*. Es va determinar l'halo d'inhibició que generava l'agent de biocontrol respecte el fong, en mm (Figura 8).



**Figura 8.** Halo d'inhibició generat per l'agent de biocontrol a *S. vesicarium*

Al cap de 11 dies de la inoculació es va seguir el mateix procés de recompte de conidis que en assajos de restes vegetals i de fulla viva (apartat 3.2.5), es va recomptar 5 discs d'una placa.

També es va col·locar la segona placa a la cambra per obtenir el creixement de pseudotecis, durant 10 dies més, passats els dies es van recomptar els pseudotecis mitjançant el mateix procediment que en assajos de restes vegetals i fulla viva (apartat 3.2.5) en els 5 discs.

L'assaig es va repetir dues vegades.

### **3.5 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol aplicats en estratègia curativa**

Els objectius de l'assaig van ser avaluar la capacitat d'inhibició del miceli, la capacitat de reducció d' esporulació i la disminució de formació de pseudotecis.

Tot això en una situació en que el *S. vesicarium* comença a interaccionar amb l'agent de biocontrol en 2 moments diferents, a 3 dies de la inoculació dels agents de biocontrol i a 24 hores.

Es va utilitzar la soca EPS26 del patogen, i pel que fa als *B. subtilis* es va utilitzar la selecció (A17,A28,A59,A128,A132,A143,A164,FZB42) i també 2 controls, els control amb aigua i el control amb LB líquid.

#### **3.5.1 Material vegetal**

El material vegetal es va obtenir i tractar de la mateixa manera que en l'assaig de tipus Preventiu (apartat 3.4.1). En total es van utilitzar 180 discs de fulla.

#### **3.5.2 Cambra humida**

Es van utilitzar safates de material plàstic amb tapa, que van permetre una correcta estanqueïtat.

#### **3.5.3 Producció d'inòcul**

Es va utilitzar el mateix sistema que en assajos de restes vegetals i fulla viva (vegeu 3.2.3) La preparació de les suspensions de *B. subtilis* en LB líquid es va portar a terme

també mitjançant el mateix mètode que en assajos de restes vegetals, de fulla viva i preventiu (apartat 3.2.3).

#### 3.5.4 Inoculacions

Es va preparar suspensió de conidis 2 vegades per cada assaig, una vegada 3 dies previs a la inoculació dels *B. subtilis* i l'altre 24 hores abans, immediatament després de preparar-la es va aplicar mitjançant immersió en una placa buida i estèril durant 5 segons dels discs de fulla. Un cop banyats es van col·locar en les safates, a raó de 2 tractaments per safata i 9 discs per cada tractament de bacteris.

L'aplicació en els discs de fulla es va portar a terme mitjançant l'aplicació 50 µl de la suspensió d'agent de biocontrol, obtingut segons els mètode utilitzat en assajos de restes vegetals, de fulla viva i preventiu (vegeu 3.2.4).

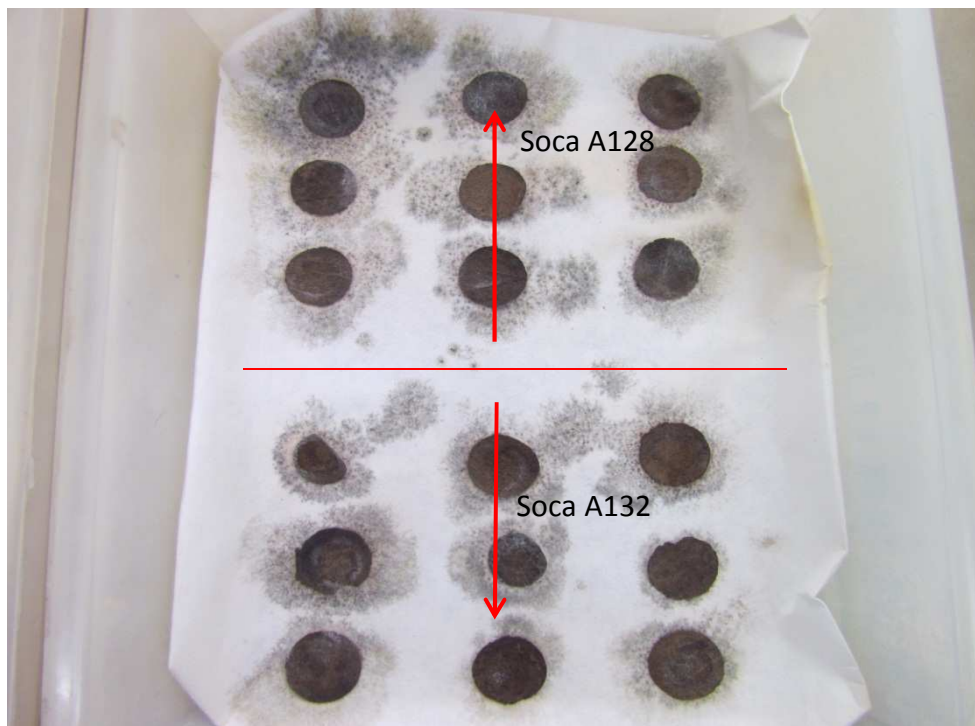
#### 3.5.5 Disseny experimental

Es van utilitzar les soques de *B. subtilis* de la selecció, A17, A28, A59, A128, A132, A143, A164, FZB42.

La soca de patogen que es va inocular va ser la EPS26.

Per cada soca es van realitzar 9 repeticions, a cada safata es van col·locar 18 discs de fulla, es a dir 2 soques que *B. subtilis* per safata. En total es van utilitzar 90 discs de fulla ( $\frac{9 \text{ discs}}{\text{soca}} \times 8 \text{ soques} + \frac{9 \text{ discs}}{\text{control}} \times 2 \text{ controls}$ ). L'assaig es va repetir 2 vegades, pel que globalment es van utilitzar 180 discs.





**Figura 9.** Exemple d'una safata utilitzada en l'assaig curatiu.

### 3.5.6 Avaluacions

Les lectures de miceli es van portar a terme a 1,4,7 i 11 dies, i es va avaluar la ocupació del disc de fulla per el miceli del fong en una escala del 0 al 5 ( 0- 0%;1-> 0-10%; 2-> 10-25%; 3 -> 25-50%; 4-> 50-75%; 5-> 100%).

Pel que fa a la quantificació de l' esporulació, a la última lectura, als 10 dies es van retirar 4 discs de les safates per avaluar-los, mitjançant el mateix mètode que en la resta d'assajos.

Un cop extrets els discs de conidis, es va procedir a posar la resta de l'assaig en fosc i T° baixes durant 10 dies més, per la producció de pseudotecis que es van avaluar com en la resta d'assajos (apartat 3.3.5).

### 3.6 Anàlisi estadístic

Per tal de comparar les diferents soques de *B. subtilis* i les diferents estratègies de tractament es va realitzar un anàlisi de la variància (ANOVA) a partir dels resultats de cada assaig. Es va utilitzar el paquet SAS, versió 9.02 (SAS Institute., Cary, NC. USA). Per fer l'anàlisi de la variància es va utilitzar el procediment GLM ( $p > 0.05$ ). La separació de mitjanes es va realitzar mitjançant el test de Tukey. L'homogeneïtat de les variàncies es va determinar mitjançant la prova de Bartlett i la normalitat dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk.

## 4. Resultats

---

### 4.1 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol mitjançant assajos de sobrecapa

#### 4.1.1 Determinació de la inhibició del miceli en l'assaig de sobrecapa.

Es va mesurar el diàmetre d'inhibició de miceli de *S. vesicarium* causat per *B. subtilis*.

L'anàlisi de la variància (ANOVA) va indicar que el tractament, el medi i el temps van tenir un efecte significatiu en l'halo d'inhibició ( $p < .0001$ ;  $R^2 = 0.675$ ), (Annex taula A1)

Analitzats individualment, l'efecte dels 3 factors (tractament, medi i temps) van ser significatius ( $p < 0.05$ ). Per aquest motiu les dades es van analitzar separatament per medi de cultiu i temps de lectura. Els resultats que es presenten van ser obtinguts als 7 dies de la inoculació.

Es presenten els resultats de l'avaluació de l'halo d'inhibició generat pels agents de biocontrol sobre el patògen, els resultats de l'avaluació estan distribuïts en tres taules segons la soca de patògen utilitzada i el medi, soca EPS26 en medi PDA (taula 2), soca EPS157 en medi V8 (taula 3).

**Taula 2.** Efecte de les 28 soques de *B. subtilis* i el control sense tractar (CH20) en la inhibició del creixement de la soca d'*S. vesicarium* EPS26 en medi V8. Els resultats corresponen a 7 dies posteriors a la inoculació del patogen. Es presenta la mitjana de 3 repeticions i l'error estàndard de la mitjana. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Dades corresponents a la primera repetició de l'assaig.

Soca de <i>B. subtilis</i>	Halo d'inhibició (mm)		Separació de mitjanes				
	Mitjana	Error estàndard					
A128	6,33	0,67				A	
A59	5,33	1,86	B			A	
A132	4,67	0,33	B		A	C	
A80	4,67	0,33	B		A	C	
A151	4,00	1,00	B	D	A	C	
A17	4,00	0,58	B	D	A	C	
FZB42	3,67	0,33	E	B	D	A	C
QST713	3,33	0,67	E	B	D	A	C
A1	3,00	0,58	E	B	D	A	C
A164	3,00	0,58	E	B	D	A	C
A69	3,00	0,00	E	B	D	A	C
A91	3,00	0,58	E	B	D	A	C
A92	2,67	1,20	E	B	D	A	C
A28	2,33	0,88	E	B	D		C
A5	2,33	0,33	E	B	D		C
A55	2,33	0,33	E	B	D		C
A85	2,33	0,33	E	B	D		C
A89	2,00	0,58	E	B	D		C
A143	1,67	0,67	E	B	D		C
A94	1,33	0,88	E		D		C
A95	1,33	0,88	E		D		C
A84	1,00	0,58	E		D		C
A90	1,00	0,58	E		D		C
A100	0,67	0,67	E		D		
A87	0,33	0,33	E		D		
A180	0,00	0,00	E				
A56	0,00	0,00	E				
A97	0,00	0,00	E				
CH20	0,00	0,00	E				

Els resultats obtinguts en el biocontrol de la soca EPS26 d'*S. vesicarium* en medi V8 mostren un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.74$ ) en la inhibició del miceli, en la prova de separació de mitjanes les soques de *B. subtilis* que millor controlen el fong són: A128, A59, A132, A80, A151 i A17 (taula 2).

**Taula 3.** Efecte de les 28 soques de *B. subtilis* i el control sense tractar, CH20 en la inhibició del creixement de la soca d'*S. vesicarium* EPS157 en medi V8. Els resultats corresponen a 7 dies posteriors a la inoculació del patogen. Es presenta la mitjana de 3 repeticions i l'error estàndard de la mitjana. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Dades corresponents a la segona repetició de l'assaig.

Soca de <i>B. subtilis</i>	Halo d'inhibició (mm)		Separació de mitjanes				
	Mitjana	Error estàndard					
A59	6,67	1,33	A				
A164	6,00	1,73	B	A			
A143	5,67	0,67	B	A	C		
A69	5,67	0,33	B	A	C		
A1	5,33	0,33	B	A	C		
A128	5,33	1,45	B	A	C		
A28	5,00	0,58	B	D	A	C	
A132	4,67	0,33	B	D	A	C	
FZB42	4,67	0,67	B	D	A	C	
A17	4,33	0,33	B	D	A	C	
A91	4,33	0,33	B	D	A	C	
A55	4,00	0,58	E	B	D	A	C
A85	4,00	0,58	E	B	D	A	C
QST713	4,00	0,58	E	B	D	A	C
A94	3,00	0,58	E	B	D	A	C
A92	2,67	0,33	E	B	D	A	C
A5	2,33	0,33	E	B	D	C	
A84	2,00	1,00	E	B	D	C	
A89	2,00	1,15	E	B	D	C	
A90	2,00	1,00	E	B	D	C	
A151	1,67	0,33	E	D		C	
A95	1,67	0,33	E	D		C	
A100	1,00	0,00	E	D			
A80	1,00	0,58	E	D			
A97	1,00	1,00	E	D			
A180	0,00	0,00	E				
A56	0,00	0,00	E				
A87	0,00	0,00	E				
CH20	0,00	0,00	E				

Els resultats obtinguts en el biocontrol de la soca EPS26 d'*S. vesicarium* en medi V8 mostren un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.78$ ) en el creixement del miceli, en la prova de separació de mitjanes les soques de *B. subtilis* que millor controlen el fong són: A59, A164, A143, A69, A1, A128, A28, A132, FZB42, A17 i A91 (taula 3).

## **4.2 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol mitjançant assajos amb restes foliars de perera.**

Es presenten els resultats en funció de la variable analitzada en l'assaig (creixement de miceli, nº conidis/disc i nº de pseudotecis/disc).

### **4.2.1 Inhibició de miceli**

L'anàlisi de la variància (ANOVA) va indicar que el tractament, l'experiment i el temps van tenir un efecte significatiu en l'halo d'inhibició ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.64$ ), (Annex taula A2).

Analitzats individualment, l'efecte dels 3 factors (tractament, experiment i temps) van ser significatius ( $p < 0.05$ ). Els resultats de creixement de miceli que es presenten van ser obtinguts als 7 dies de la inoculació.

En primer lloc es mostren els resultats de l'anàlisi de la variable d'inhibició de miceli, repartits en dues taules (taula 4 i taula 5), referents a les 2 repeticions del mateix assaig portades a terme.

**Taula 4.** Efecte de les 28 soques de *B. subtilis* en el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en el creixement de la soca d'*S. vesicarium* EPS26 de l'assaig de restes vegetals de perera . Els resultats corresponen a 7 dies posteriors a la inoculació del patogen. Es presenta la mitjana de 28 repeticions i l'error estàndard de la mitjana. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Dades corresponents a la primera repetició de l'assaig.

Soca de <i>B. subtilis</i>	Creixement del miceli (mm)		Separació de mitjanes					
	Mitjana	Error estàndard						
A92	3,32	0,41			A			
A87	3,10	0,31		B	A			
A84	2,85	0,13		B	A	C		
A164	2,71	0,34		B	D	A	C	
A80	2,71	0,14		B	D	A	C	
A85	2,50	0,20	E	B	D	A	C	
A5	2,10	0,44	E	B	D	A	C	F
A143	2,03	0,43	E	B	D	A	C	F
A56	2,03	0,10	E	B	D	A	C	F
A100	1,89	0,40	E	B	D	A	C	F
A180	1,85	0,34	E	B	D		C	F
A128	1,82	0,41	E	B	D		C	F
A59	1,82	0,19	E	B	D		C	F
A89	1,82	0,24	E	B	D		C	F
CLB	1,82	0,09	E	B	D		C	F
FZB42	1,82	0,21	E	B	D		C	F
A55	1,78	0,18	E	B	D		C	F
A69	1,75	0,10	E	B	D		C	F
A132	1,53	0,28	E		D		C	F
A1	1,46	0,15	E		D		C	F
A151	1,42	0,48	E		D		C	F
A90	1,30	0,18	E		D			F
A95	1,28	0,11	E		D			F
CH20	1,26	0,10	E		D			F
A97	1,25	0,20	E					F
QST714	1,21	0,20	E					F
A17	1,00	0,23						F
A28	0,92	0,17						F
A94	0,78	0,16						F
A91	0,75	0,27						F

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol té un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.49$ ) respecte el creixement del miceli.

El grup F va ser el que millor control va presentar ja que la variable presentada era el creixement del miceli, a menor creixement major control de la malaltia, les soques que la van formar eren la A17, A28, A94 i A91. Malgrat tot cap tractament va mantenir diferències significatives amb el control amb LB (taula 4).

Pel que fa a la segona repetició els resultats obtinguts en el biocontrol de la soca EPS26 d'*S. vesicarium* en l'assaig de restes vegetals van mostrar un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.87$ ) en el creixement del miceli.

En la prova de separació de mitjanes les soques de *B. subtilis* que millor controlen el fong són: A56, A151, A164, A32, A55, A128, A28, A17, A1 i A5 ja que es distingeixen del tractament CLB, (taula 5).



**Taula 5.** Efecte de les 28 soques de *B. subtilis* el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en el creixement de la soca d'*S. vesicarium* EPS26 de l'assaig de restes vegetals de perera . Els resultats corresponen a 7 dies posteriors a la inoculació del patogen. Es presenta la mitjana de 28 repeticions i l'error estàndard de la mitjana. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Dades corresponents a la segona repetició de l'assaig.

Soca de <i>B. subtilis</i>	Creixement del miceli (mm)		Separació de mitjanes			
	Mitjana	Error estàndard				
CH20	3,32	0,15	A			
A89	3,03	0,20	B	A		
A85	2,92	0,08	B	A	C	
A94	2,89	0,21	B	A	C	
A91	2,85	0,15	B	A	C	
A87	2,67	0,15	B	D	A	C
A92	2,53	0,28	B	D	C	
A80	2,50	0,20	B	D	C	
A84	2,39	0,14	B	D	C	
A97	2,35	0,24	B	D	E	C
A69	2,32	0,13	B	D	E	C
A95	2,28	0,10	B	D	E	C
FZB42	2,25	0,18	D		E	C
A90	2,21	0,17	D		E	C
A100	2,17	0,13	D		E	C
A180	2,00	0,12	D		E	
CLB	1,58	0,12	F	E		
A59	1,07	0,04	F	G		
QST714	0,96	0,03	F	G		
A143	0,92	0,07	F	G		
A5	0,78	0,08	G			
A1	0,75	0,07	G			
A128	0,75	0,05	G			
A17	0,75	0,16	G			
A28	0,75	0,09	G			
A55	0,75	0,07	G			
A132	0,71	0,11	G			
A164	0,67	0,08	G			
A151	0,64	0,09	G			
A56	0,46	0,08	G			

#### 4.2.2 Determinació del control de l'esperulació

**Taula 6.** Efecte de les 28 soques de *B. subtilis* el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) l'esperulació de la soca d'*S. vesicarium* EPS26 de l'assaig de restes vegetals de perera . Els resultats corresponen a 7 dies posteriors a la inoculació del patogen. Es presenta la mitjana de 14 repeticions i l'error estàndard de la mitjana. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Soca de <i>B. subtilis</i>	Nº de conidis / dos discs		Separació de mitjanes				
	Mitjana	Error estàndard					
FZB42	47,07	8,10				A	
CLB	41,14	5,35	B			A	
QST713	36,14	8,20	B			A	C
A56	31,28	9,36	B	D		A	C
A5	28,71	8,74	E	B	D	A	C
A90	25,42	3,56	E	B	D	A	C
A17	25,16	6,67	E	B	D	A	C
A89	25,14	5,48	E	B	D	A	C
A85	24,14	8,06	E	B	D	A	C
A91	21,50	4,60	E	B	D	A	C
A128	21,35	4,23	E	B	D	A	C
A164	20,28	4,23	E	B	D	A	C
A97	19,57	4,62	E	B	D	A	C
A132	18,78	6,08	E	B	D		C
A151	18,57	4,65	E	B	D		C
CH20	17,85	2,51	E	B	D		C
A59	14,21	4,84	E	B	D		C
A1	13,57	5,14	E	B	D		C
A95	12,78	2,82	E		D		C
A28	12,28	1,87	E		D		C
A180	11,92	1,94	E		D		C
A69	11,71	3,50	E		D		C
A92	11,14	1,76	E		D		C
A94	11,00	1,73	E		D		C
A87	10,42	3,34	E		D		C
A100	9,42	2,27	E		D		C
A55	7,57	2,66	E		D		
A143	4,71	1,19	E		D		
A80	4,57	1,36	E		D		
A84	3,42	1,75	E				

Els resultats obtinguts en el biocontrol de la soca EPS26 d'*S. vesicarium* en l'assaig de restes vegetals mostren un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.34$ ) en l'esperulació del miceli.

Les soques del grup CDE van presentar diferències significatives amb el control CLB, vam se les: A95, A28, A180, A69, A92, A94, A87, A100, A55, A143, A80 i A84, segons la prova de separació de mitjanes (taula 6).

#### 4.2.3 Determinació de la formació de pseudotecis

**Taula 7.** Efecte de les 28 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB), en la disminució de la formació de pseudotecis de la soca d'*S. vesicarium* EPS26 en l'assaig en restes vegetals de perera. El valor de la mitjana fa referència a la mitja entre les 14 dades en que es va mesurar el nº de pseudotecis en 2 discs de la mateixa fulla. Es representa l'error estàndard de la mitjana a la columna d'error. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Nº de pseudotecis / dos discs							
Soca de <i>B. subtilis</i>	Mitjana	Error estàndard	Separació de mitjanes				
A56	212,85	35,33				A	
A87	154,14	13,98	B			A	
A17	129,50	19,25	B		A	C	
A85	120,71	18,14	B		D	C	
A28	120,14	10,83	B		D	C	
A95	119,07	26,79	B	E	D	C	
CH20	116,61	14,66	B	E	D	C	
CLB	107,95	15,85	F	B	E	D	C
QST713	107,57	15,68	F	B	E	D	C
A89	103,85	15,79	F	B	E	D	C
A5	103,14	24,82	F	B	E	D	C
A1	98,14	16,83	F	B	E	D	C
A151	94,75	12,56	F	B	E	D	C
A132	91,57	8,46	F	B	E	D	C
A92	89,07	13,39	F	B	E	D	C
A55	86,28	24,25	F	B	E	D	C
A94	84,64	10,06	F	B	E	D	C
A97	83,00	9,80	F	B	E	D	C
A91	77,85	7,54	F	B	E	D	C
A128	73,35	15,29	F	B	E	D	C

La taula continua a la pàgina següent

Nº de pseudotecis / dos discs							
Soca de <i>B. subtilis</i>	Mitjana	Error estàndard	Separació de mitjanes				
A164	73,21	18,71	F	B	E	D	C
A100	64,07	13,20	F		E	D	C
A59	61,71	12,08	F		E	D	C
A90	60,14	10,05	F		E	D	C
A143	48,85	7,89	F		E	D	C
A180	46,85	8,58	F		E	D	C
A69	45,42	6,74	F		E	D	C
FZB42	33,42	7,73	F		E	D	
A80	31,57	6,49	F		E		
A84	27,00	5,67	F				

Els resultats obtinguts en el biocontrol de la soca EPS26 d'*S. vesicarium* en l'assaig de restes vegetals mostren un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.33$ ) en la formació de pseudotecis.

Segons la separació de mitjanes, no hi ha cap soca de *B. subtilis* que aconseguixi un control de la malaltia significativament per sobre el control LB (CLB) (taula 7).

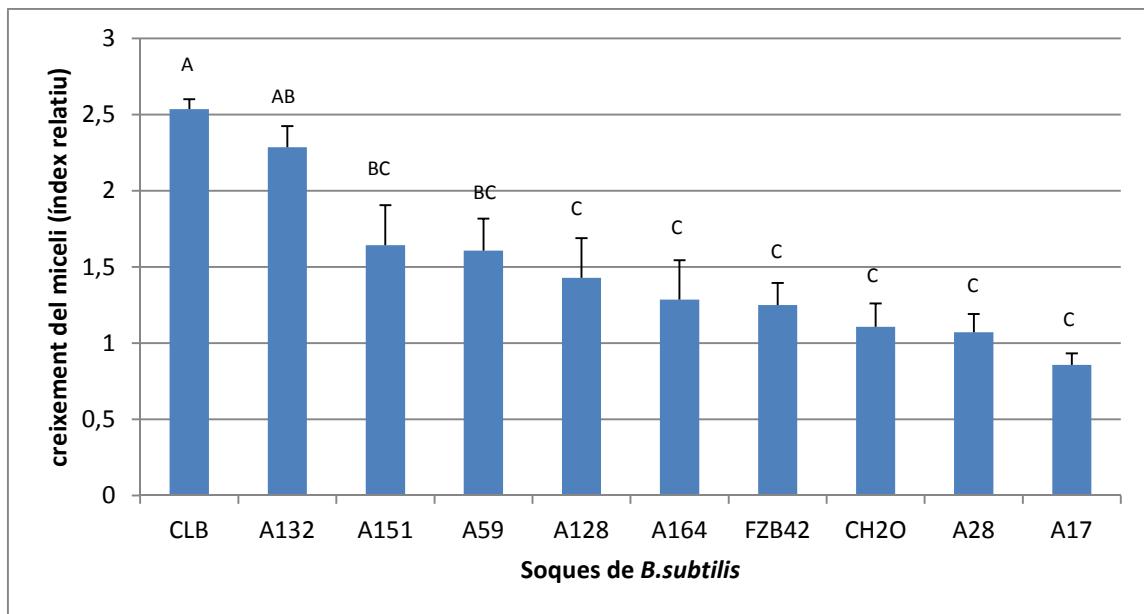
### 4.3 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol en assajos de fulla viva en perera.

Es presenten els resultats en funció de la variable analitzada en l'assaig (inhibició de miceli, nº conidis/disc i nº de pseudotecis/disc).

Segons la ANOVA global de creixement de miceli com a variable dependent, no hi va haver diferències significatives entre experiments ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.64$ ) tot i així es presenten els resultats per separat (Annexos taula A3).

### 4.3.1 Determinació del control de creixement de miceli

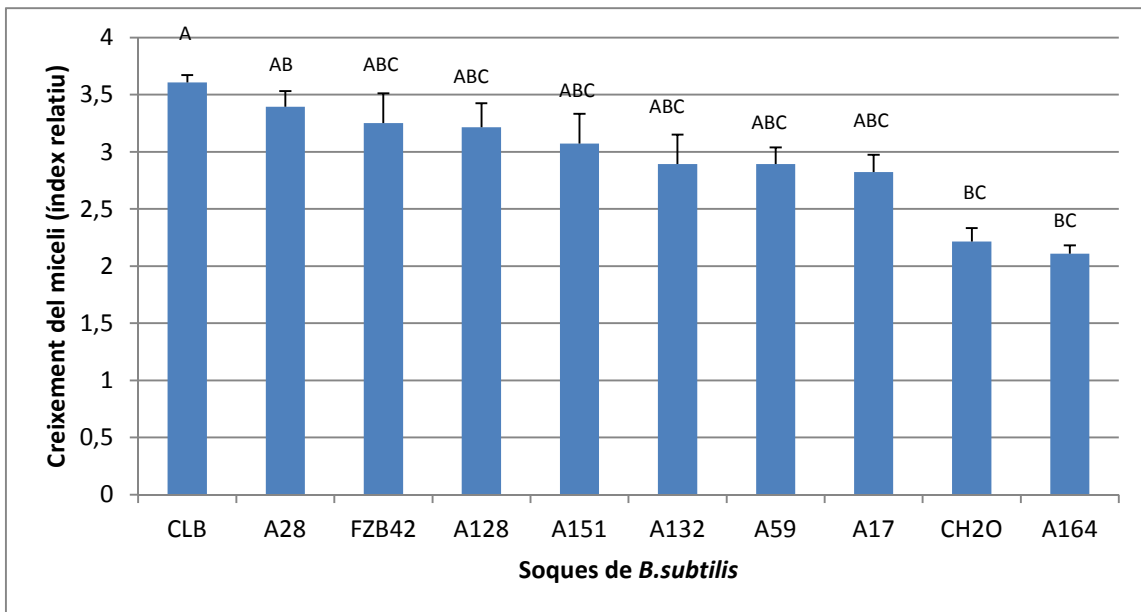
Es presenten els resultats en forma de 2 gràfics (figura 9 i 10), referents a cada repetició de l'assaig.



**Figura 9.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en la reducció de creixement de miceli de la soca EPS26 de patogen en fulles de perera vives. Les barres corresponen a la mitjana de 28 lectures del creixement del miceli i els resultats van ser obtinguts a 7 dies de la inoculació del patogen. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la 1ra repetició de l'assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol té un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.56$ ) en el creixement del miceli.

La separació de mitjanes mostra 4 grups. El tractament menys efectiu va ser el control CLB, que va diferir dels grups BC i C segons aquesta prova, així que les soques eficaces van ser: A151, A59, A128, A164, FZB42, A28, A17 (figura 9).



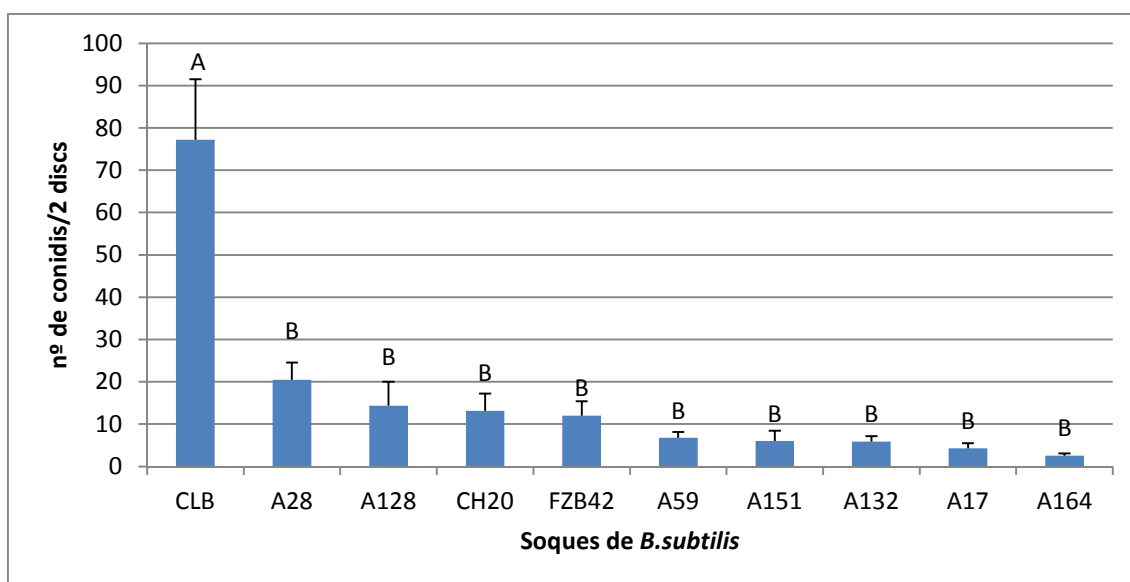
**Figura 10.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en la reducció de creixement de miceli de la soca EPS26 de patògen en fulles de perera vives. Les barres corresponen a la mitjana de 28 lectures en que es va determinar el creixement del miceli i aquests resultats van ser obtinguts a 7 dies de la inoculació del patògen. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la 2na repetició de l'assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.32$ ) en el creixement del miceli.

Segons la separació de mitjanes, es va poder veure que hi va haver 4 grups. Els grup A es va formar pel control LB, i només va mostrar diferències significatives amb el grup BC, per tant amb la soca A164 (figura 10).

### 4.3.2 Determinació del control de l' esporulació en l'assaig de fulla viva de perera

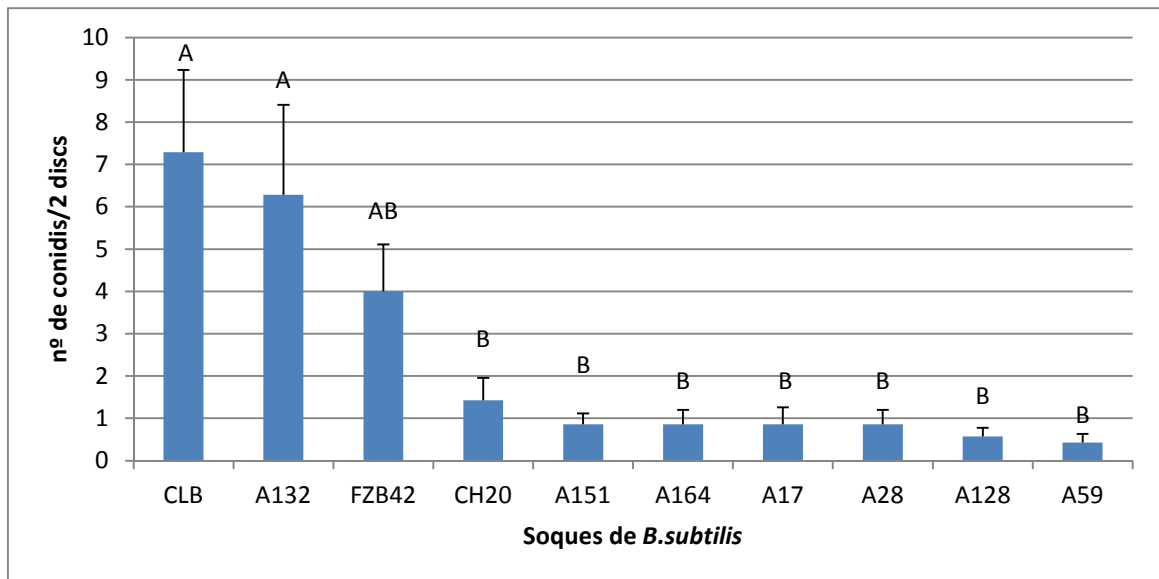
Es presenten els resultats en forma de 2 gràfics referents a l'assaig de fulla viva de perera pel que fa a la variable d' esporulació del fong (figura 11 i 12).



**Figura 11.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en l' esporulació de la soca EP26 de patogen en fulles de perera vives. Les barres corresponen a la mitjana de 14 lectures en que es van determinar el nº de conidis per cada 2 discs de fulla. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades fan referència a la 1ra repetició.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.74$ ) en l' esporulació del patogen.

Segons la separació de mitjanes s'observen dos grups. El grup A format pel control amb LB i el grup B, amb un efecte significatiu en el control del patogen, format per les 8 soques d'agent de biocontrol restants. (figura 11).



**Figura 12.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en l'esperulació de la soca EP26 de patogen en fulles de perera vives. Les barres corresponen a la mitjana de 14 lectures en que es van determinar el nº de conidis per cada 2 discs de fulla. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades fan referència a la 2na repetició.

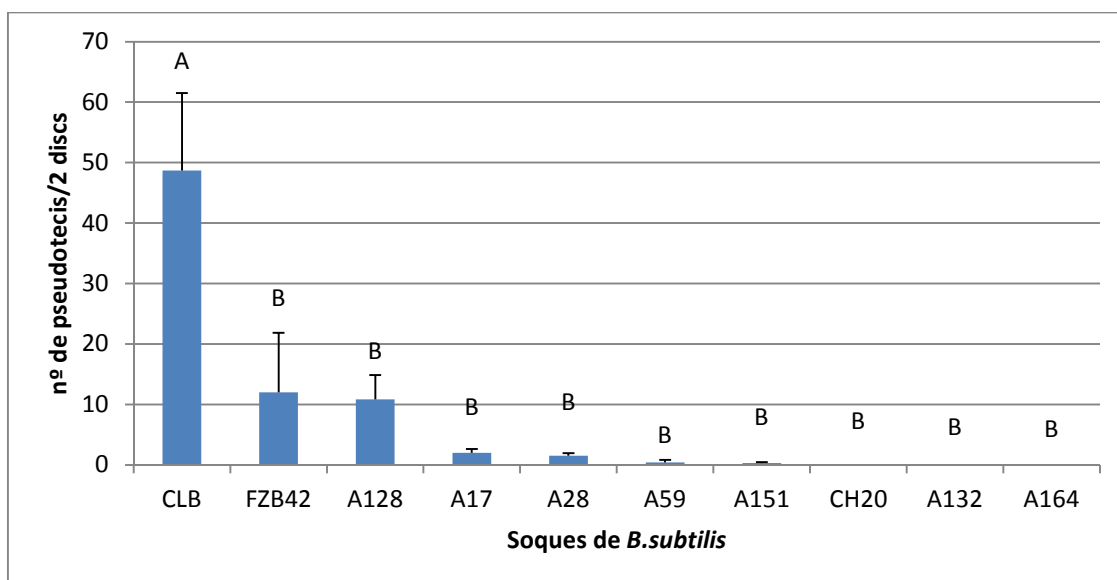
Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.49$ ) en l'esperulació del patogen.

Segons la separació de mitjanes s'observen tres grups. El grup A format pel control amb LB i la soca A132, el grup AB sense diferències amb el control CLB i el grup B format per 6 soques d'agent de biocontrol, A151, A164, A17, A28, A128, A59 (figura 12).



### 4.3.3 Determinació del control de la formació de pseudotecis en l'assaig de fulla viva de perera

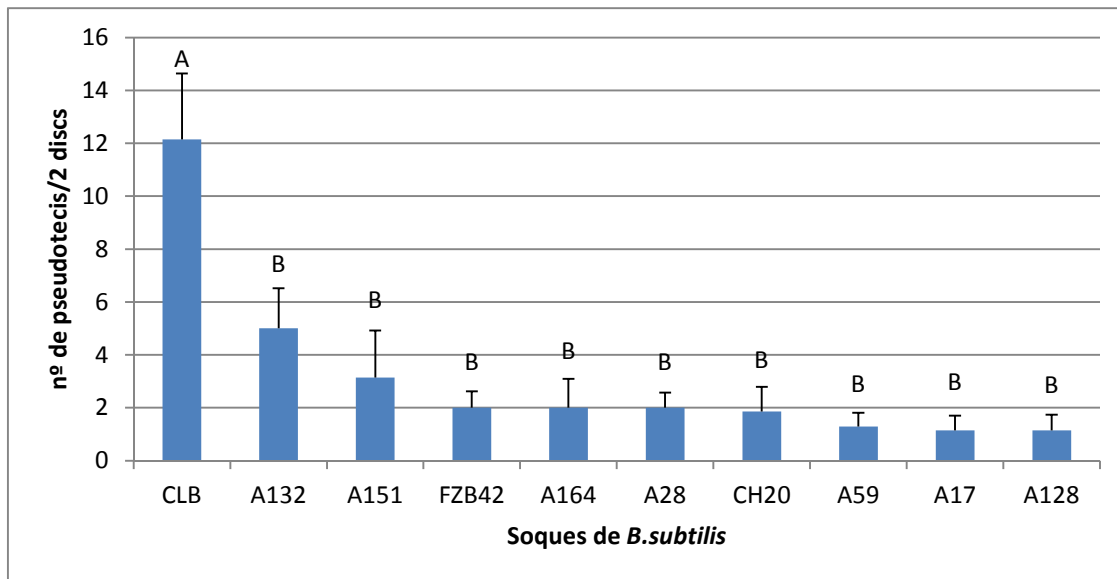
Es presenten mitjançant 2 gràfics els resultats que es van obtenir en l'assaig de fulla viva de perera pel que fa a la variable de pseudotecis (figura 13 i 14).



**Figura 13.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en la formació de pseudotecis de la soca EP26 de patògen en fulles de perera vives. Les barres corresponen a la mitjana de 14 lectures en que es van determinar el nº de pseudotecis per cada 2 discs de fulla. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades fan referència a la 1ra repetició de l'assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.57$ ) en la formació de pseudotecis.

Segons la separació de mitjanes s'observen dos grups diferenciats significativament, el grup A amb el control amb LB i el grup B amb major eficiència de control compost per les soques: A151, A59, A128, A164, FZB42, A28, A17 i A132 (figura 13).



**Figura 14.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en la formació de pseudotecis de la soca EP26 de patògen en fulles de perera vives. Les barres corresponen a la mitjana de 14 lectures en que es van determinar el nº de pseudotecis per cada 2 discs de fulla. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades fan referència a la 2na repetició de l'assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.52$ ) en la formació de pseudotecis.

Segons la separació de mitjanes s'observen dos grups diferenciats significativament, el grup A amb el control amb LB i el grup B amb bona eficiència de control format per les soques: A151, A59, A128, A164, FZB42, A28, A17 i A132 (figura 14).

## **4.4 Determinació de l'eficàcia dels agents de biocontrol de aplicats de manera curativa**

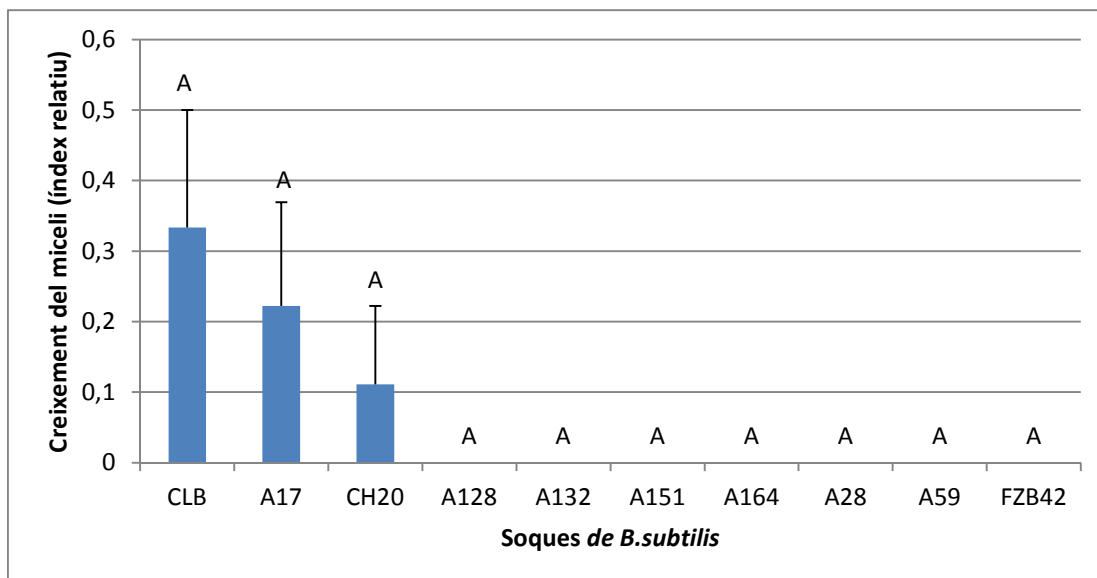
Segons l'anàlisi de la variància, es va determinar que l'aplicació dels agents de biocontrol, l'estratègia (aplicació d'agents de biocontrol a 1 i 3 dies després de l'inici d'infecció) i l'experiment tenen un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.63$ ) en el creixement del miceli en el disc de fulla (Annexos taula A4).

Tot i així analitzats de manera independent els tres factors, l'estratègia no mostra un efecte significatiu ( $p > 0.05$ ;  $R^2 = 0.63$ ) sobre la resta de factors.

Es presenten els resultats en funció de la variable analitzada en l'assaig (inhibició de miceli, nº conidis/disc i nº de pseudotecis/disc).

### **4.4.1 Determinació del control del creixement de miceli en aplicacions curatives**

Es representen els resultats en l'assaig de l'estratègia curativa tractant amb agent de biocontrol 1 dia després de la inoculació del patogen (figura 15).

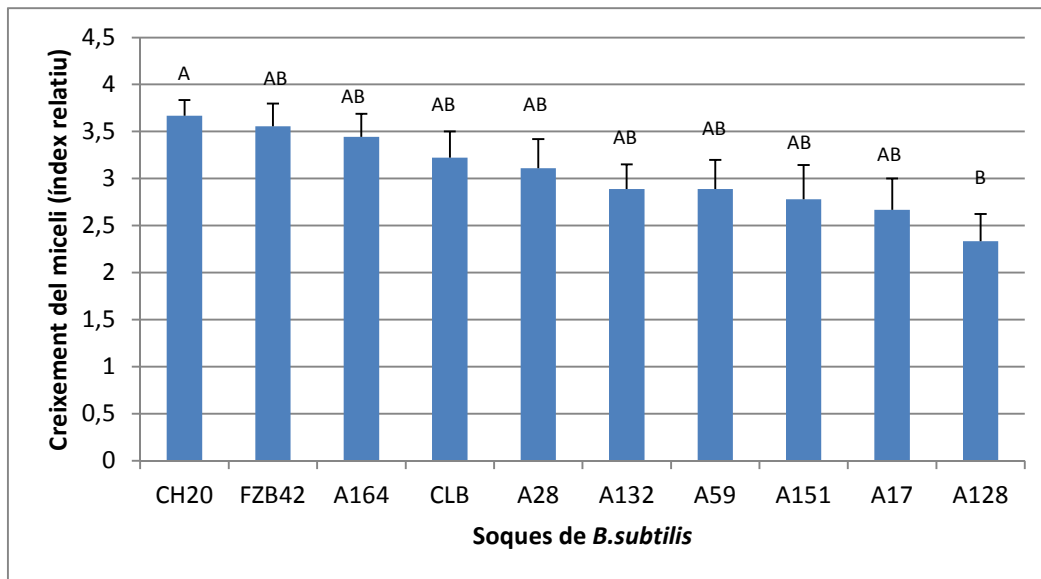


**Figura 15.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en el creixement de la soca EP26 de patògen en discos de fulla morta. Els agents de biocontrol es van aplicar 1 dia després de la inoculació del patògen. L'agent de biocontrol es va aplicar un dia després de la inoculació del patògen. Les barres corresponen a la mitjana de 9 lectures realitzades a 7 dies de l'aplicació de l'agent de biocontrol. Es va determinar el percentatge d'ocupació del disc de fulla per part del miceli mitjançant un índex relatiu. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen al 1r assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, l'aplicació dels agents de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.21$ ) en el creixement del miceli.

Respecte la prova de separació de mitjanes es va determinar que no hi va haver diferències significatives entre tractaments.

Es representen els resultats en l'assaig de l'estratègia curativa tractant amb agent de biocontrol 1 dia després de la inoculació del patògen (figura 16).

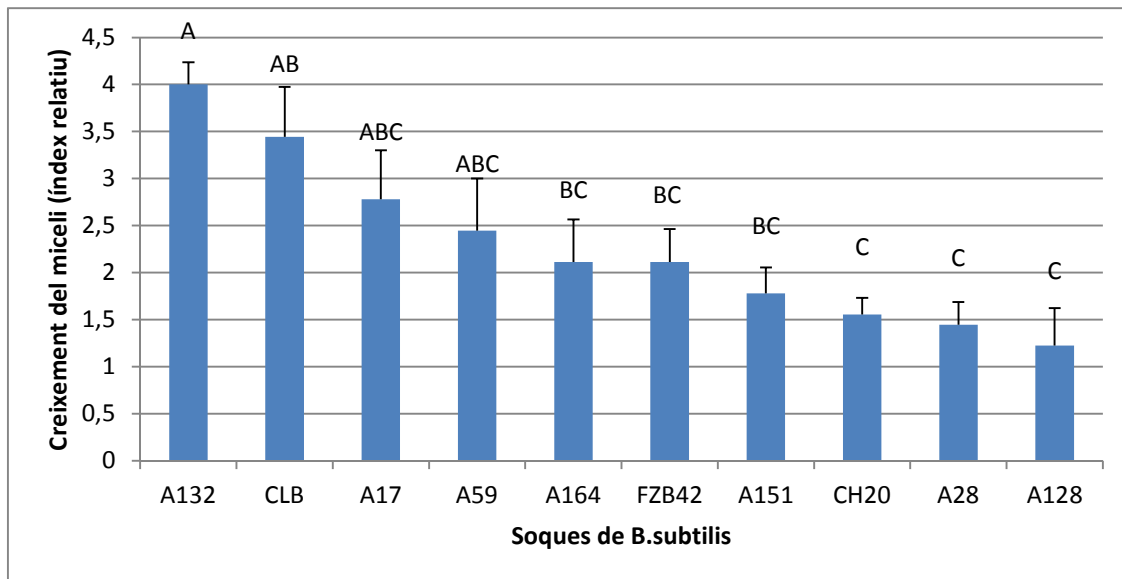


**Figura 16.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en el creixement de la soca EP26 de patògen en discs de fulla morta. Els agents de biocontrol es van aplicar 1 dia després de la inoculació del patògen. Les barres corresponen a la mitjana de 9 lectures realitzades a 7 dies de la inoculació de l'agent de biocontrol. Es va determinar el percentatge d'ocupació del disc de fulla per part del miceli mitjançant un índex relatiu. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen al 2n assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.20$ ) respecte el creixement del miceli, tot i així cal tenir en compte que el coeficient de variació va ser bastant baix.

Respecte la prova de separació de mitjanes es van mostrar 3 grups. Només la soca A128 (B) va mostrar una bona eficàcia diferint del control CLB (A), la resta de soques del grup AB no van mostrar diferències significatives amb el control del grup A (figura 16).

Es representen els resultats de creixement de miceli en l'estratègia de tractament 3 dies posteriors a la inoculació del patògen (figura 17).

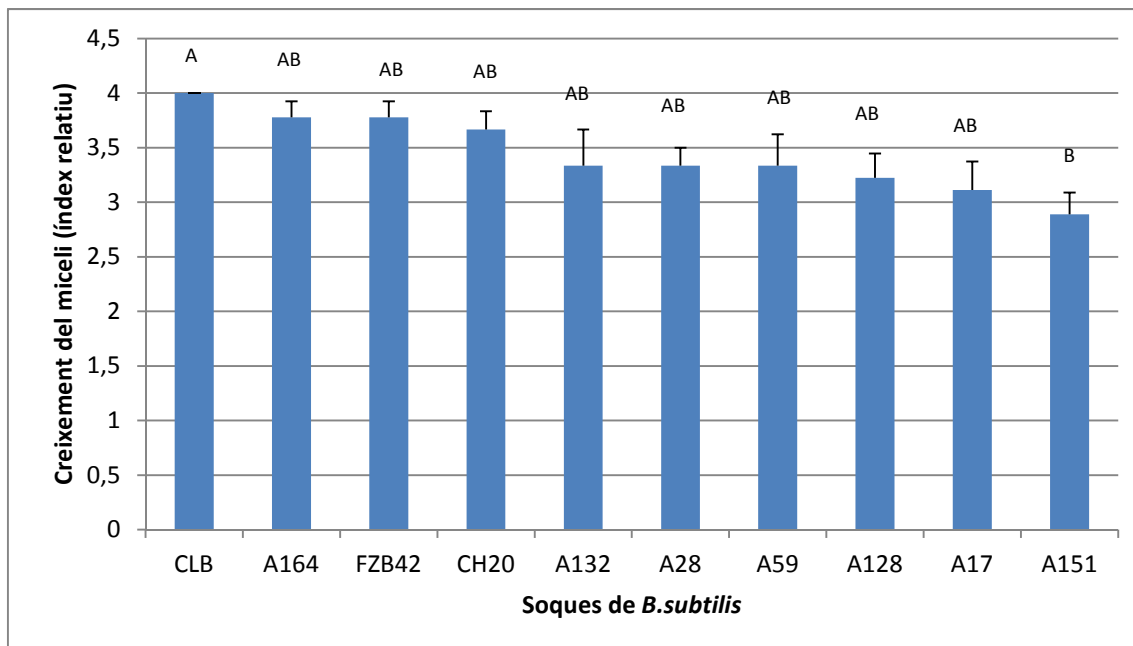


**Figura 17.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en el creixement de la soca EP26 de patògen en discs de fulla morta. Els agents de biocontrol es van aplicar 3 dies després de la inoculació del patògen. Les barres corresponen a la mitjana de 9 lectures realitzades a 7 dies de la inoculació de l'agent de biocontrol. Es va determinar el percentatge d'ocupació del disc de fulla per part del miceli mitjançant un índex relatiu. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Dades corresponents al primer assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.37$ ) en el creixement del miceli.

A partir de la separació de mitjanes es va veure que es van formar 5 grups. Les Soques A28 i A128 es van diferenciar significativament del control CLB, la resta no (figura 17).

Es representen els resultats de creixement de miceli en l'estratègia de tractament 3 dies posteriors a la inoculació del patogen (figura 18).



**Figura 18.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en el creixement de la soca EP26 de patogen en discs de fulla morta. Els agents de biocontrol es van inocular 3 dies després de la inoculació del patogen. Les barres corresponen a la mitjana de 9 lectures a 7 dies de la inoculació de l'agent de biocontrol. Es va determinar el percentatge d'ocupació del disc de fulla per part del miceli mitjançant un índex relatiu. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Dades corresponents al segon assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.23$ ) en el creixement del miceli.

A partir de la separació de mitjanes es va veure que es van formar 3 grups.

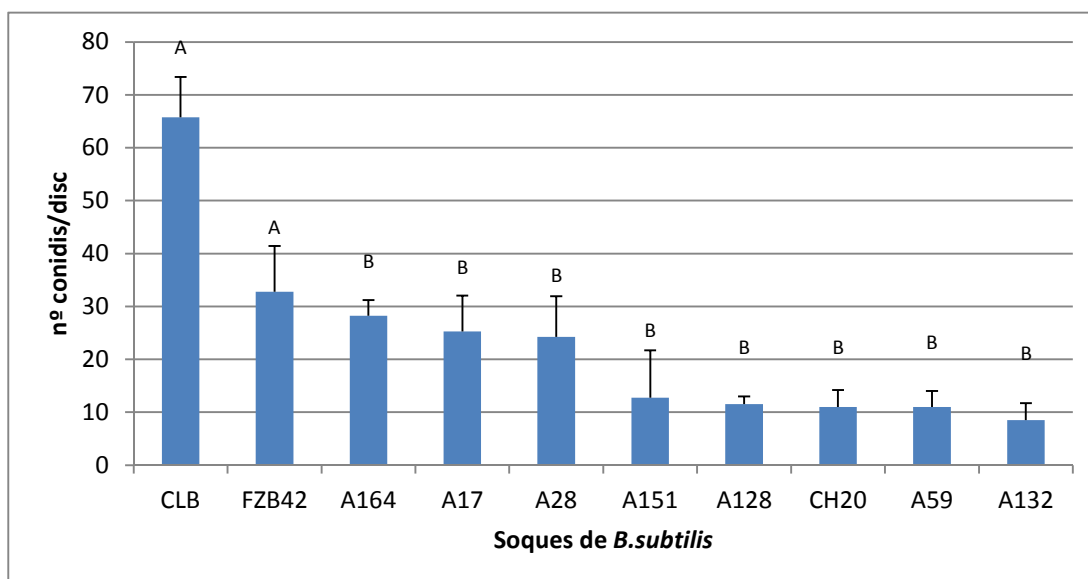
Nomes la soca A151 (B) mostra diferències significatives en el control, la resta de soques (AB) no difereixen del control CLB (A) (figura 18).

#### 4.4.2 Determinació de l' esporulació en l' assaig d'estratègies d'aplicació dels agents de biocontrol de manera curativa.

Es va poder veure com el tractament, l'estratègia (aplicació dels agents de biocontrol a 1 i 3 dies després de la inoculació del fong) i la rèplica de l'assaig van tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.62$ ) en la reducció de l' esporulació (Annexos taula A5).

Tot i així es presenten els resultats separats per assajos.

Es presenten en el següent gràfic els resultats de l' esporulació en l'estratègia curativa inoculant 1 dia després de l'inici de la infecció, en la repetició 1 de l'assaig (figura 19).



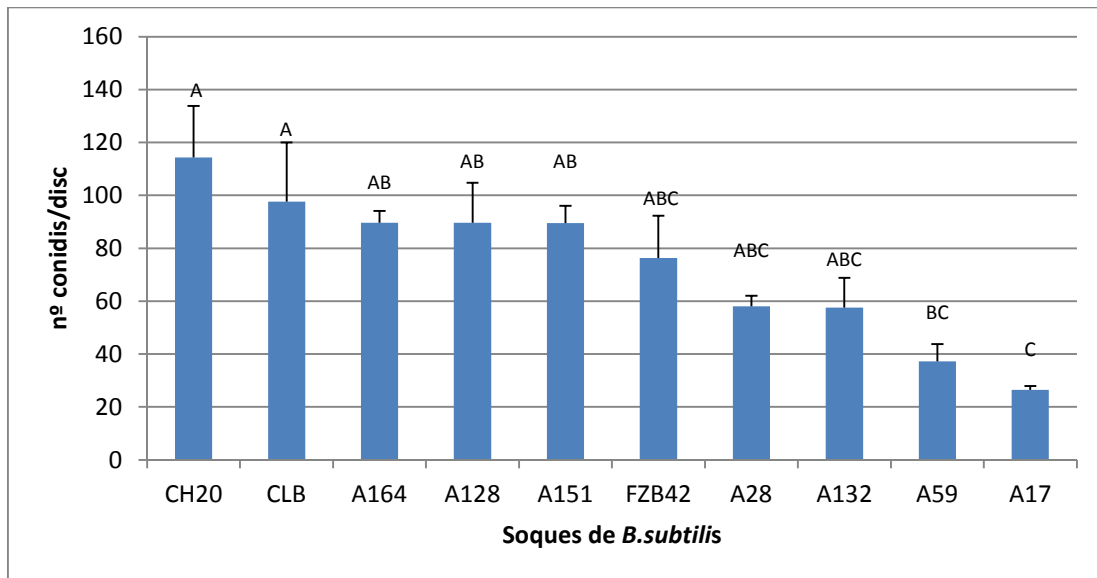
**Figura 19.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en l' esporulació de la soca EP26 de patògen en discs de fulla morta. L'aplicació dels agents de biocontrol es va fer 1 dia després de la inoculació del fong. Les barres corresponen a la mitjana de 4 lectures. Es va determinar en nº de conidis per cada disc de fulla. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Dades corresponents a la 1ra repetició.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.71$ ) en l' esporulació del patògen.

Segons la separació de mitjanes, les soques A164, A17, A28, A151, A128, A59, A132 (B) van mostrar diferències significatives amb el control CLB (A) en canvi la soca FZB42 (A) no va mostrar diferència amb el control (figura 19).



Es presenten els resultats de l' esporulació en l'estratègia curativa inoculant 1 dia després de l'inici de la infecció, en la repetició 2 de l'assaig (figura 20).

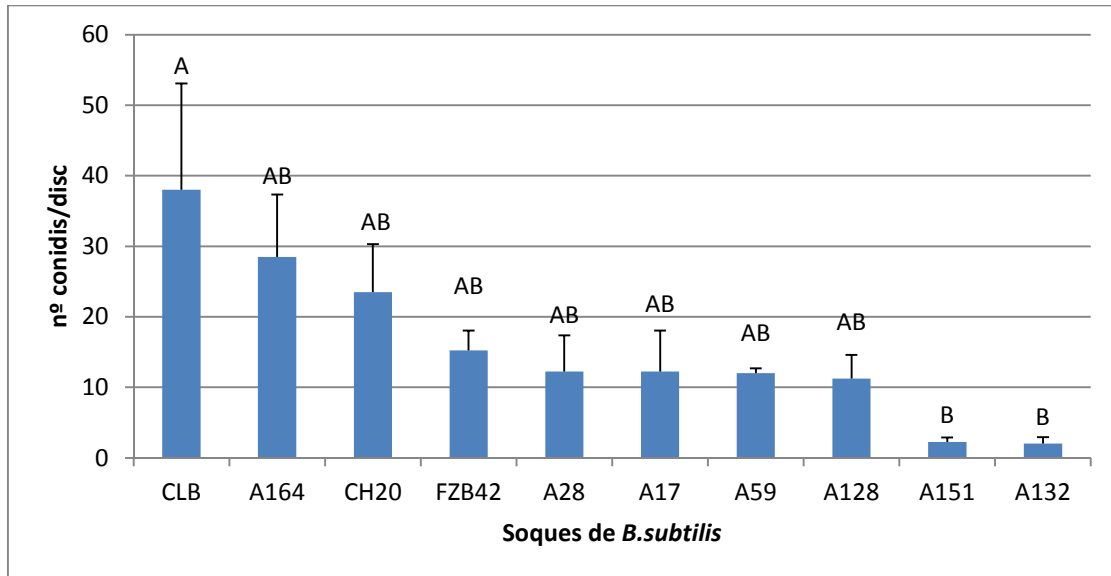


**Figura 20.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control amb aigua (CH20) i el control amb LB (CLB) en l' esporulació de la soca EP26 de patogen en discs de fulla morta. L'aplicació dels agents de biocontrol es va fer 1 dia després de la inoculació del fong. Les barres corresponen a la mitjana de 4 lectures. Es va determinar en nº de conidis per cada disc de fulla. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la 2na repetició.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol van tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.70$ ) en l' esporulació del patogen.

Segons la separació de mitjanes, les soques A59 i A17 (BC i C respectivament) van mostrar diferències significatives amb el control CLB (A). La resta de soques dels grups AB i ABC no es van diferenciar del control (figura 20).

Es presenten els resultats de l' esporulació en l'estratègia curativa inoculant 3 dies després de l'inici de la infecció, en la repetició 1 de l'assaig (figura 21).

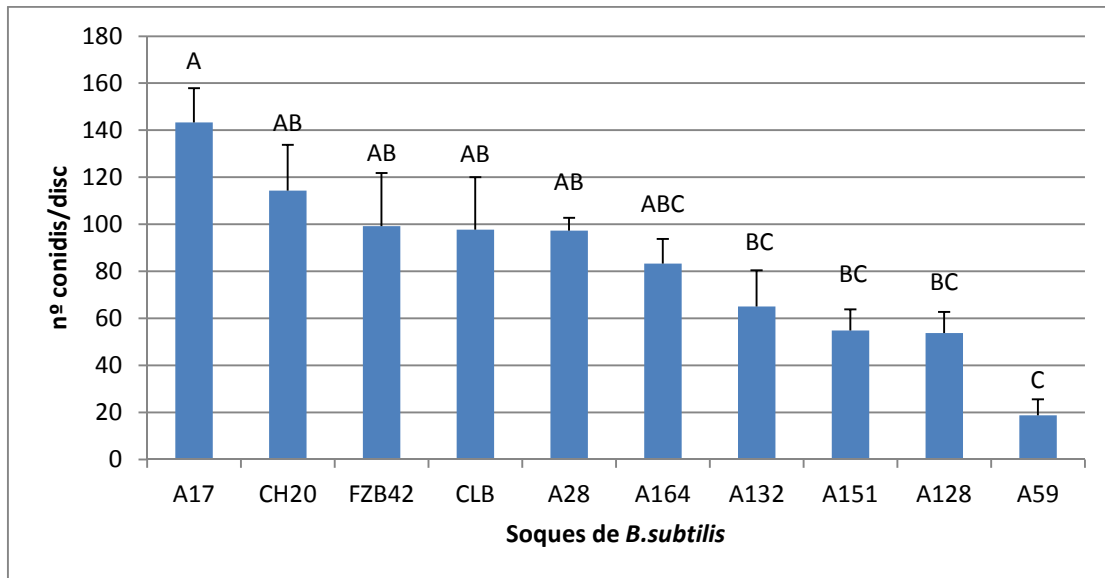


**Figura 21.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en la reducció de l' esporulació de la soca EP26 de patogen en discs de fulla de perera morta. Cada forma correspon a la mitjana de 4 valors en que es va determinar el nº de conidis per cada disc. L'aplicació dels agents de biocontrol es va fer 3 dies després de la inoculació del fong . Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. La lletra damunt la mitjana indica la separació de mitjanes segons la prova de Tukey. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Fisher ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la 1ra repetició.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.70$ ) en l' esporulació del patogen.

Les soques que van mostrar diferències significatives respecte el control CLB (A) van ser les A151 i A132 (B), la resta (AB) no van mostrar diferències segons la separació de mitjanes (figura 21).

Es presenten els resultats de l' esporulació en l'estratègia curativa inoculant 3 dies després de l'inici de la infecció, en la repetició 2 de l'assaig (figura 22).



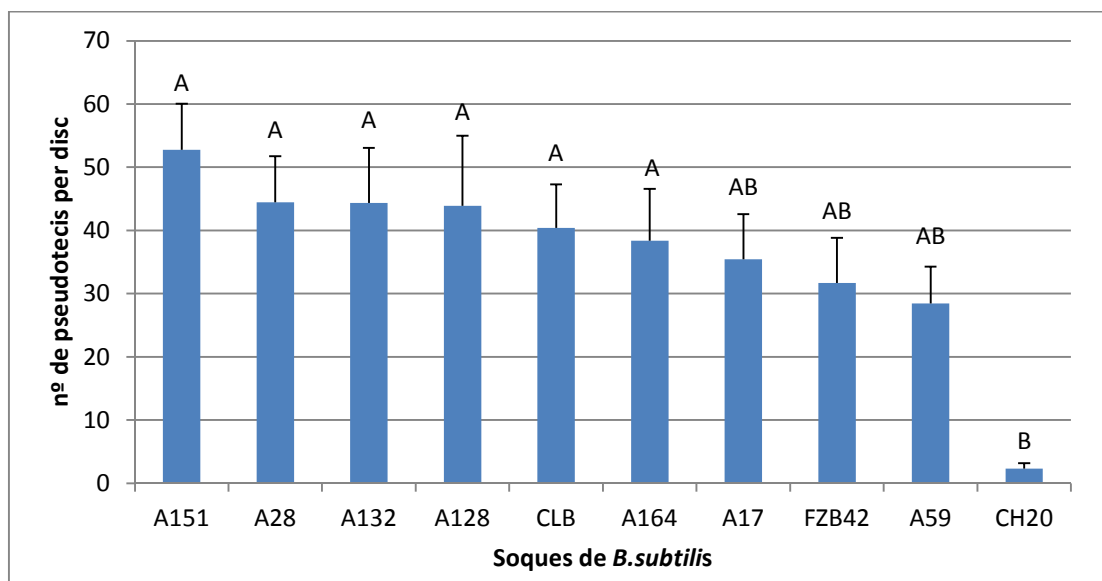
**Figura 22.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en la reducció de l' esporulació de la soca EP26 de patogen en discs de fulla de perera morta. Cada forma correspon a la mitjana de 4 valors en que es va determinar el nº de conidis per cada disc. L'aplicació dels agents de biocontrol es va fer 3 dies després de la inoculació del fong. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. La lletra damunt la mitjana indica la separació de mitjanes segons la prova de Tukey. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Fisher ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la 2na repetició.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.68$ ) en l' esporulació del patogen.

Segons la separació de mitjanes, la soca A59 (C) va mostrar diferències significatives sobre el control CLB (AB) (figura 22).

#### 4.4.3 Determinació del control de la formació de pseudotecis en l'assaig d'estratègies d'aplicació dels agents de biocontrol de manera curativa.

Es presenten els resultats de l'esperulació en l'estratègia curativa aplicant l'agent de biocontrol 1 dia després de l'inici de la infecció, en la repetició 1 de l'assaig (figura 23).

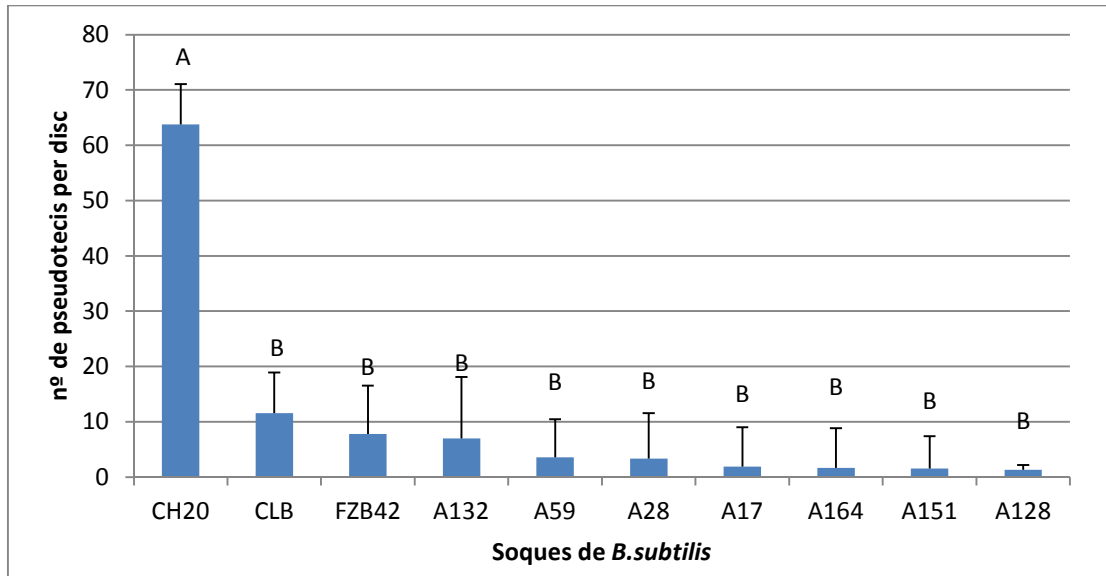


**Figura 23.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en la formació de pseudotecis de la soca EP26 de patògen en discs de fulla de perera morta. Cada forma correspon a la mitjana de 5 valors en que es va determinar el nº de pseudotecis per cada disc. L'aplicació dels agents de biocontrol es va fer 1 dia després de la inoculació del fong. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Dades corresponents a la repetició 1 de l'assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.29$ ) en l'esperulació del patògen.

Segons la separació de mitjanes, no hi va haver cap soca que millorés significativament el control respecte el tractament CLB (figura 23).

Es presenten els resultats de l' esporulació en l'estratègia curativa aplicant l'agent de biocontrol 1 dia després de l'inici de la infecció, en la repetició 2 de l'assaig (figura 24).

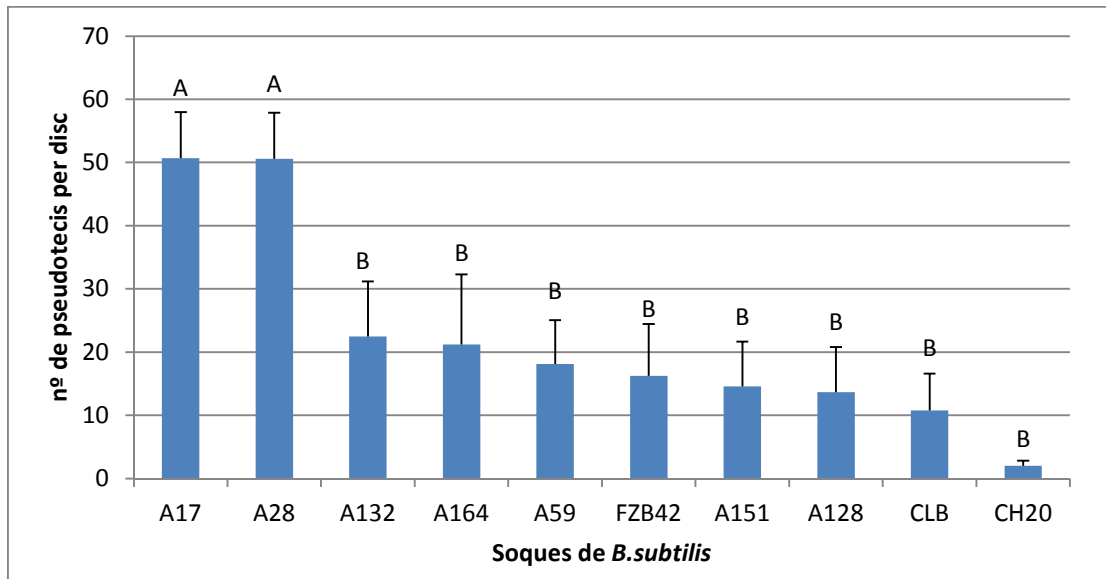


**Figura 24.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en la formació de pseudotecis de la soca EP26 de patògen en discs de fulla de perera morta. Cada forma correspon a la mitjana de 5 valors en que es va determinar el nº de pseudotecis per cada disc. L'aplicació dels agents de biocontrol es va fer 1 dia després de la inoculació del fong. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la repetició 2.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.68$ ) en l' esporulació del patògen.

En la separació de mitjanes es va observar com en els tractaments amb soques de *B. subtilis* no hi va haver diferències significatives respecte el control CLB (figura 24).

Es presenten els resultats de l' esporulació en l'estratègia curativa aplicant l'agent de biocontrol 3 dies després de l'inici de la infecció, en la repetició 1 de l'assaig (figura 25).

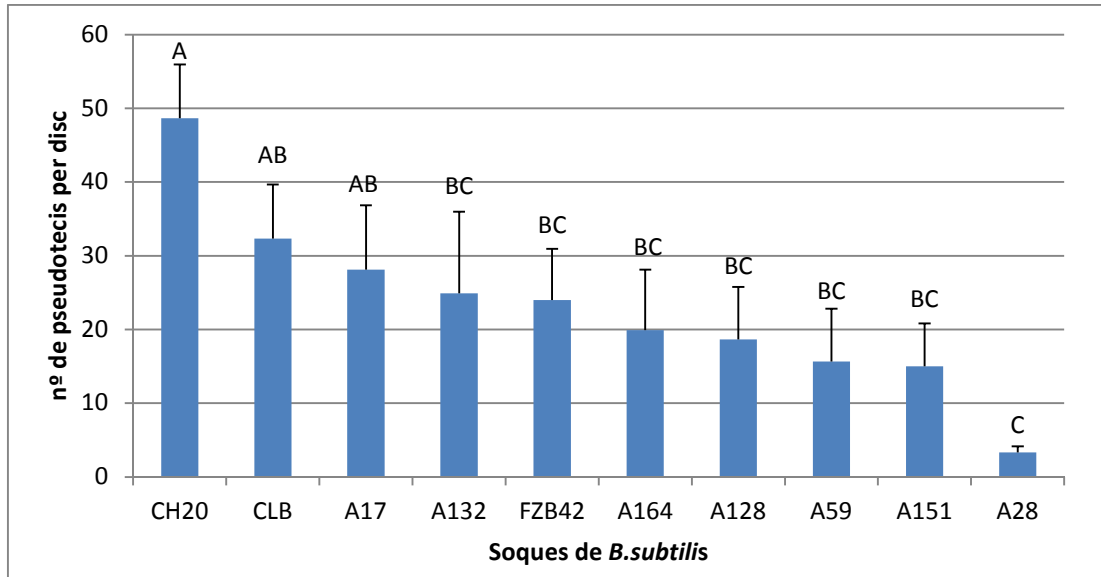


**Figura 25.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en la formació de pseudotecis de la soca EP26 de patògen en discs de fulla de perera morta. Cada forma correspon a la mitjana de 5 valors en que es va determinar el nº de pseudotecis per cada disc. L'aplicació dels agents de biocontrol es va fer 3 dies després de la inoculació del fong. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la 1ra repetició de l'assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.48$ ) en l' esporulació del patògen.

Pel que fa a la separació de mitjanes cap soca es va diferenciar significativament del control CLB pel que fa a eficàcia (figura 25).

Es presenten els resultats de l'esperulació en l'estratègia curativa aplicant l'agent de biocontrol 3 dies després de l'inici de la infecció, en la repetició 2 de l'assaig (figura 26).



**Figura 26.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en la formació de pseudotecis de la soca EP26 de patògen en discs de fulla de perera morta. Cada forma correspon a la mitjana de 5 valors en que es va determinar el nº de pseudotecis per cada disc. L'aplicació dels agents de biocontrol es va fer 3 dies després de la inoculació del fong. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la repetició 2.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.39$ ) en l'esperulació del patògen.

En la separació de mitjanes es va veure com només la soca A28 es va diferenciar del control CLB (figura 26).

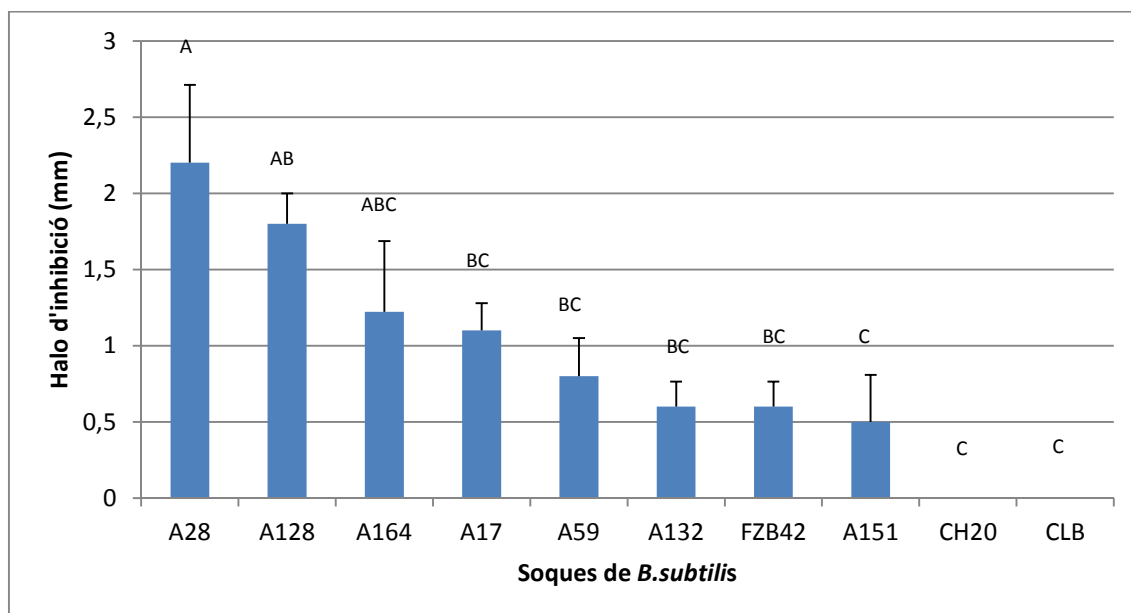
## 4.5 Determinació de l'eficàcia de control dels agents de biocontrol aplicats de manera preventiva

Es presenten els resultats en funció de la variable analitzada en l'assaig (inhibició de micel.li, nº conidis/disc i nº de pseudotecis/disc).

### 4.5.1 Determinació del creixement de miceli en estratègia preventiva

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.371$ ) sobre l'halo d'inhibició de miceli en el global de les 2 repeticions (Annexos taula A6).

Es mostren els resultats de la 1ra repetició de l'assaig en forma de gràfic, pel que fa a la inhibició del creixement del miceli (figura 27).



**Figura 27.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en el creixement de miceli de la soca EP26 de patògen en discs de fulla de perera morta. La inoculació del patògen es va realitzar en placa 5 dies abans de la incorporació del material vegetal sa i tractat amb agent de biocontrol. Cada forma correspon a la mitjana de 10 valors. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les Dades corresponen a la 1ra repetició.

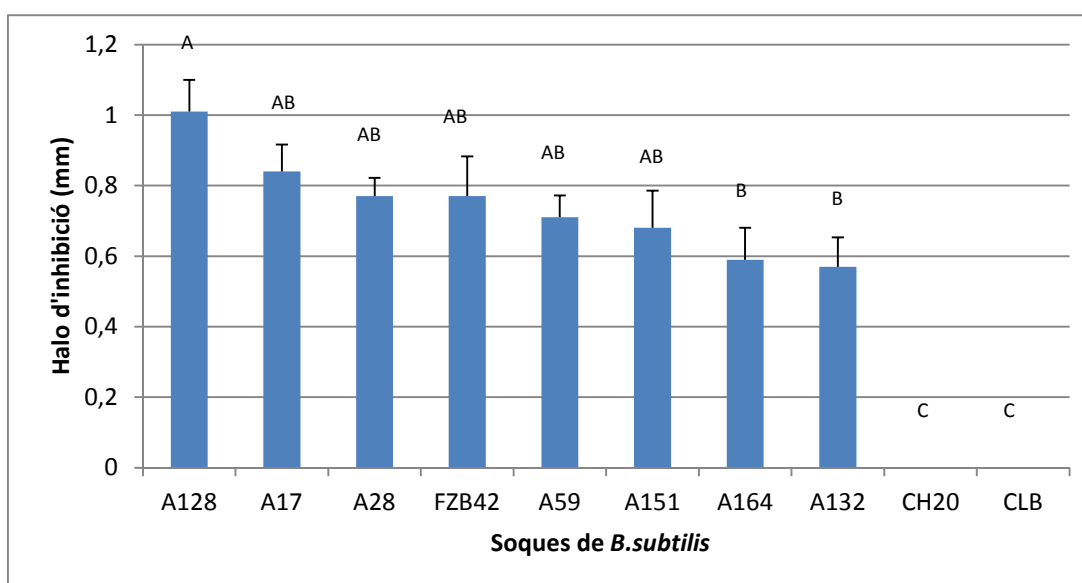


Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.42$ ) en el creixement del miceli.

Cal tenir en compte que la variable mesurada és la inhibició i no el creixement, per tant a més inhibició millor control.

Pel que fa a la prova de separació de mitjanes, es va veure que hi havia 5 grups. Les 2 soques que es van diferenciar significativament del control CLB (C) van ser les soques A28 i A128 (A i AB respectivament), la resta no van mostrar diferències amb el control (figura 27).

Es mostra el resultat de la 2na repetició de l'assaig, pel que fa a inhibició del creixement del miceli (figura 28).



**Figura 28.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en el creixement de miceli de la soca EP26 de patogen en discs de fulla de perera morta. Cada forma correspon a la mitjana de 10 valors. La inoculació del patogen es va realitzar en placa 5 dies abans de la incorporació del material vegetal sa i tractat amb agent de biocontrol. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la 2na repetició de l'assaig.

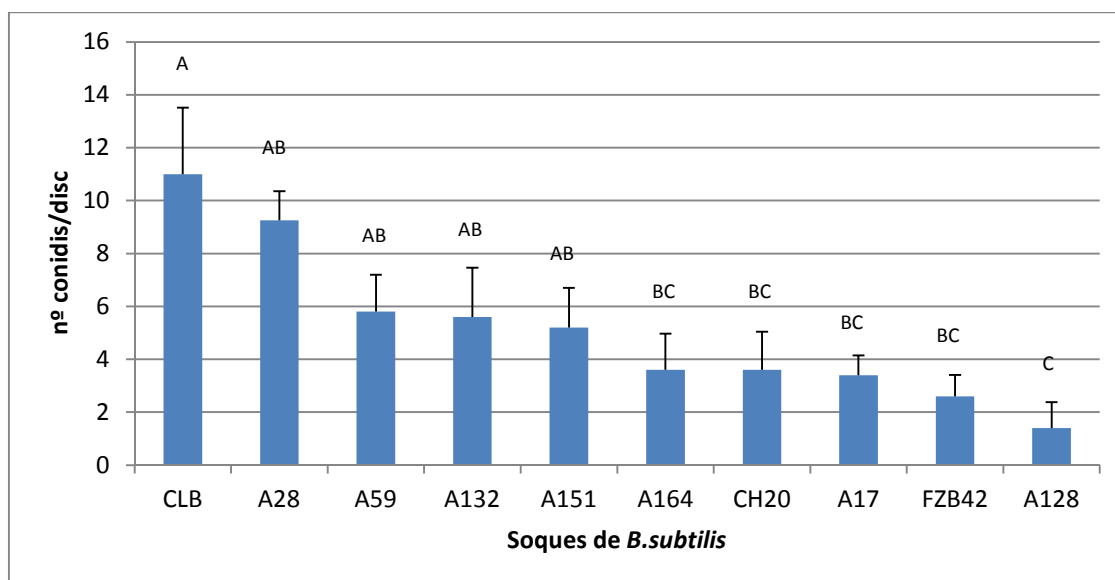
Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.66$ ) en el creixement del miceli.

La separació de mitjanes va mostraren 4 grups.

Totes les soques (grups A, AB i B) es diferencien significativament del control CLB (C) per tant tenen una bona eficàcia en el control en aquest cas (figura 28).

#### 4.5.2 Determinació de l'esperulació en estratègia preventiva

Es presenten en la figura 29 els resultats obtinguts en l'assaig d'estratègia preventiva pel que fa a la variable d'esperulació.



**Figura 29.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en l'esperulació de la soca EP26 de patògen en discos de fulla de perera morta. Cada forma correspon a la mitjana de 10 valors en que es va determinar el nº de conidis per cada disc. La inoculació del patògen es va realitzar en placa 5 dies abans de la incorporació del material vegetal sa i tractat amb agent de biocontrol. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb *B. subtilis* va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.49$ ) en la reducció d'esperulació del patògen.

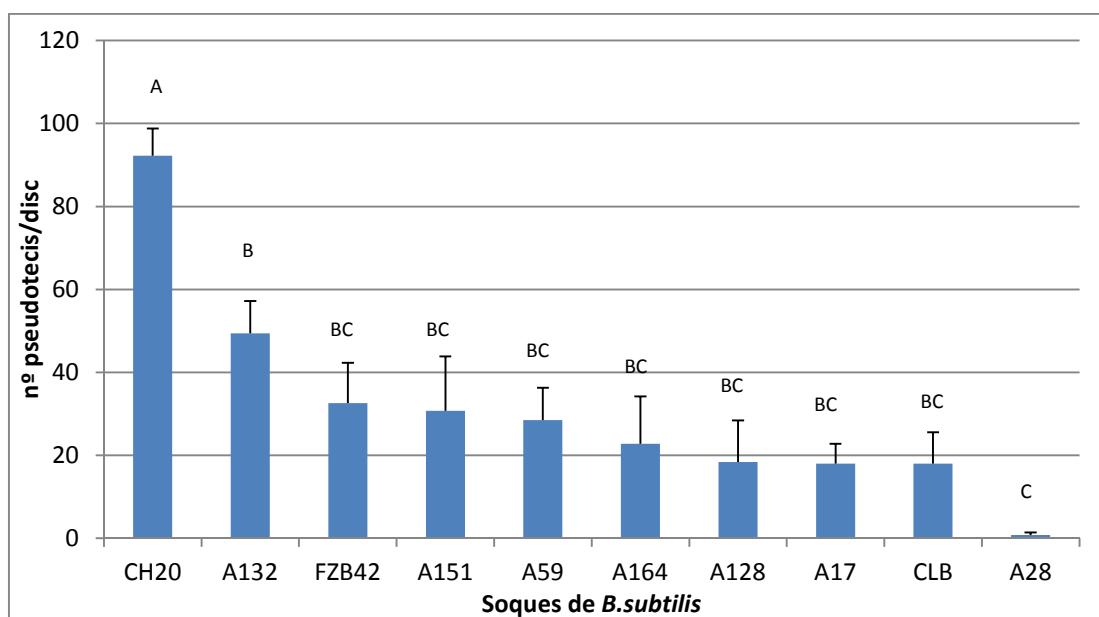
Pel que fa a la separació de mitjanes, es van determinar 4 grups. En primer lloc el grup A, amb el control amb LB que va obtenir la menor eficàcia de tractament. En segon lloc el grup AB, es va formar per les soques A28, A59, A132 i A151 que no es va diferenciar del control, i per últim els grups BC i C (A164, A17, FZB42 i A128) que si es van

diferenciar significativament del control i per tant van mostrar una bona eficàcia (figura 29).

En la segona repetició, no representada, totes les soques van inhibir l'esperulació del patogen, excepte els 2 controls.

#### 4.5.3 Determinació de la formació de pseudotecis en estratègia preventiva

En el global de les dues rèpliques, segons l'anàlisi de la variància es va poder determinar que el tractament amb agents de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.49$ ) en la quantitat de pseudotecis per disc de fulla. Es presenten els resultats de la primera repetició de l'assaig d'estratègia preventiva pel que fa a la variable de pseudotecis (figura 30).

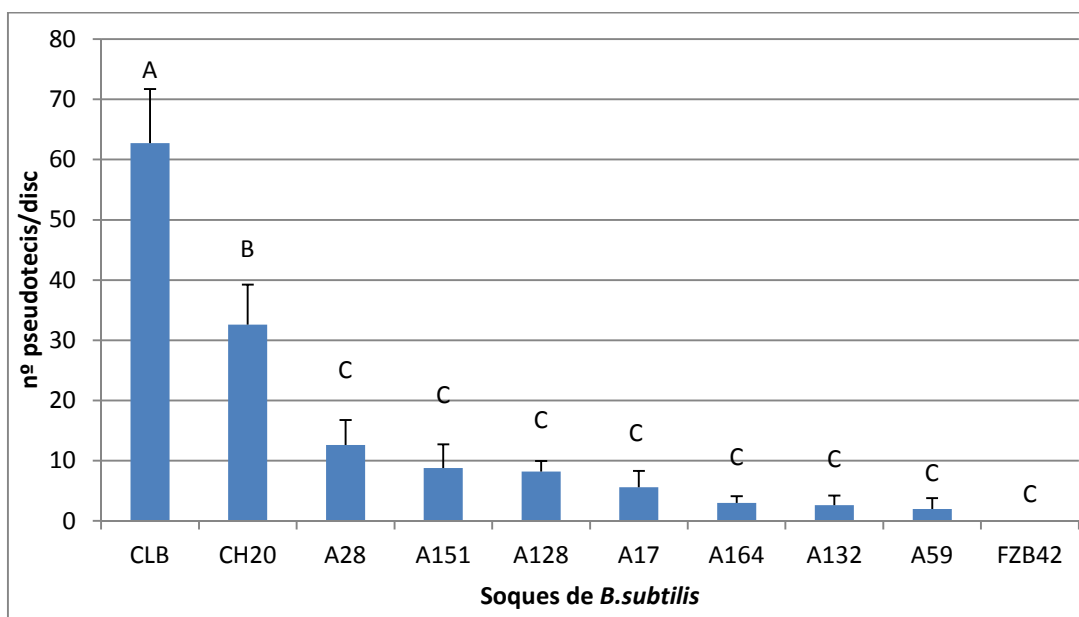


**Figura 30.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en la formació de pseudotecis de la soca EP26 de patogen en discs de fulla de perera morta. Cada forma correspon a la mitjana de 5 valors en que es va determinar el nº de pseudotecis per cada disc. La inoculació del patogen es va realitzar en placa 5 dies abans de la incorporació del material vegetal sa i tractat amb agent de biocontrol. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la 1ra repetició de l'assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.68$ ) en la reducció de formació de pseudotecis.

Cap soca va mostrar diferències significatives respecte el control CLB, per tant no hi va haver eficàcia de tractament per part de cap soca en aquest cas (figura 30).

Es presenten els resultats de la 2na repetició de l'assaig d'estratègia preventiva pel que fa a la variable de pseudotecis (figura 31).



**Figura 31.** Efecte de les 8 soques de *B. subtilis*, el control sense tractar (CH20) i el control amb LB (CLB) en la formació de pseudotecis de la soca EP26 de patògen en discs de fulla de perera morta. Cada forma correspon a la mitjana de 5 valors en que es va determinar el nº de pseudotecis per cada disc. La inoculació del patògen es va realitzar en placa 5 dies abans de la incorporació del material vegetal sa i tractat amb agent de biocontrol. Es representa l'error estàndard de la mitjana amb l'interval de la part superior de la barra. Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons la prova de Tukey ( $p < 0.05$ ). Les dades corresponen a la 2na repetició de l'assaig.

Segons l'anàlisi de la variància, el tractament amb agent de biocontrol va tenir un efecte significatiu ( $p < 0.05$ ;  $R^2 = 0.84$ ) en la reducció de formació de pseudotecis.

Segons la separació de mitjanes, es van distingir 3 grups molt diferenciats entre si.

Al grup A i el B, es van agrupar en ells els controls amb LB i el control sense tractar respectivament donant els nivells més baixos de control de l'inòcul, així que la resta de

soques van tenir eficàcia de control del patogen, van ser les soques del grup C, la A28, A151, A17, A164, A132, A59 i FZB42 (figura 31).

## 4.6 Resultats globals del treball

### 4.6.1 Taula resum dels resultats de sobrecapa

**Taula 8.** Resum dels resultats dels assajos de sobrecapa classificats mitjançant un índex relatiu de l'1 al 15, on 15 significa que la soca no va mostrar diferències significatives respecte el control i els números de l'1 al 14 signifiquen que hi va haver diferències significatives respecte el control. Els números propers a 1 van controlar millor el patogen que números propers al 14, tot i no mostrar diferències significatives entre si.

Soca de <i>B. subtilis</i>	Repetició 1 (inhibició de miceli)	Repetició 2 (inhibició de miceli)	Global
A59	2	1	3
A128	1	6	7
A132	3	8	11
A17	6	10	16
A164	15	2	17
A143	15	3	18
A69	15	4	19
A80	4	15	19
A1	15	5	20
A151	5	15	20
A28	15	7	22
FZB42	15	9	24
A91	15	11	26
A100	15	15	30
A180	15	15	30
A5	15	15	30
A55	15	15	30
A56	15	15	30
A84	15	15	30
A85	15	15	30
A87	15	15	30
A89	15	15	30
A90	15	15	30
A92	15	15	30
A94	15	15	30
A95	15	15	30
A97	15	15	30
CH20	15	15	30
QST713	15	15	30

Valors globals per sota de 30, indiquen soques que han mostrat alguna diferència significativa amb el control, i les 4 primeres soques han mostrat diferències significatives en les 2 repeticions (taula 8).

#### 4.6.2 Taula resum dels resultats de l'assaig de restes vegetals de perera

**Taula 9.** Resum dels resultats dels assajos de restes vegetals de perera classificats mitjançant un índex relatiu de l'1 al 30, on 30 significa que la soca no va mostrar diferències significatives respecte el control i els números de l'1 al 29 signifiquen que hi va haver diferències significatives respecte el control. Els números propers a 1 van controlar millor el patogen que números superiors, tot i no mostrar diferències significatives entre si. La mitjana fa referència al valor mig de les dues repeticions de creixement de miceli.

Soca	Mitjana (R1,R2) creixement de miceli	Esporulació	Global
A28	4,5	11	15,5
A55	17,5	4	21,5
A94	16,0	7	23,0
A143	20,5	3	23,5
A84	26,0	1	27,0
A100	23,0	5	28,0
A80	26,5	2	28,5
A180	22,5	10	32,5
A69	25,0	9	34,0
A92	27,0	8	35,0
A17	5,5	30	35,5
A87	30,0	6	36,0
A95	24,5	12	36,5
A56	15,5	30	45,5
A91	15,5	30	45,5
A151	16,0	30	46,0
A164	16,5	30	46,5
A132	17,0	30	47,0
A128	19,0	30	49,0
A1	19,5	30	49,5
A5	20,0	30	50,0
QST714	21,0	30	51,0
A59	21,5	30	51,5
CLB	22,0	30	52,0
A90	23,5	30	53,5
FZB42	24,0	30	54,0
A97	25,5	30	55,5
A85	30,0	30	60,0
A89	30,0	30	60,0
CH20	30,0	30	60,0

Els resultats són variables i amb poca continuïtat entre les diferents variables analitzades, tot i així com a millors soques es van prendre: A28, A55, A94 i A143 (taula 9).

#### **4.6.3 Taula resum dels assajos de fulla de perera viva i d'estratègies**

En la figura anterior (taula 10) es mostra la classificació dels resultats dels assajos d'estratègies i de fulla de perera viva per tal de avaluar quines soques mostren millor capacitat de control.

La classificació es va elaborar mitjançant una puntuació de l'1 al 8 sempre que les soques mostressin diferències significatives amb el control, essent 1 la més efectiva i fins a 8 la que menys. A les soques que no van mostrar diferències significatives amb el control CLB la puntuació assignada va ser un 10.

De la suma de tots els valors es va obtenir un índex, que a menor valor, major eficàcia de control, tot i que les diferències entre si poden no ser significatives.

**Taula 10.** Resum dels resultats de les 8 soques de *B. subtilis* utilitzades en els assajos de fulla de perera viva i en els assajos d'estratègies. Els resultats estan ordenats de l'1 al 8 de manera que la soca 1 va controlar més que la 2 tot i que pot ser o no de manera significativa. Totes les soques amb una nombre de l'1 al 8 van mostrar diferències significatives amb el control CLB, una casella amb el número 10 representa que la soca no va mostrar diferències significatives amb aquest control. En l'encapçalament, les abreviatures R1,R2 fan referència a la repetició 1 i la repetició 2 respectivament i en l'estratègia curativa, les abreviatures 3D i 1D fan referència a si l'agent de biocontrol es va aplicar 3 dies després del patògen o 1 dia després.

Soca	Fulla de perera viva						Assaig d'estratègia curativa												Assaig d'estratègia preventiva						Total
	miceli		esporulació		pseudotecis		miceli				esporulació				pseudotecis				miceli		esporulació		pseudotecis		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1 1D	R2 2D	R1 3D	R2 3D	R1 1D	R2 2D	R1 3D	R2 3D	R1 1D	R2 1D	R1 3D	R2 3D	R1	R2	R1	R2	R1	R2	
<b>A28</b>	2	10	8	3	5	4	1	10	2	10	5	10	10	10	10	10	10	1	1	3	8	1	10	8	152
<b>A128</b>	5	10	7	2	7	1	10	10	1	10	3	10	10	10	10	10	10	10	2	1	1	1	10	6	157
<b>A59</b>	6	10	5	1	4	3	10	10	10	10	2	2	10	1	10	10	10	10	10	5	7	1	10	2	159
<b>A17</b>	1	10	2	4	6	2	10	10	10	10	6	1	10	10	10	10	10	10	10	2	3	1	10	5	163
<b>A164</b>	4	1	1	5	1	5	10	10	10	10	7	10	10	10	10	10	10	10	10	7	4	1	10	4	170
<b>A151</b>	7	10	4	6	3	7	10	10	10	1	4	10	2	10	10	10	10	10	10	6	5	1	10	7	173
<b>A132</b>	10	10	3	10	2	8	10	10	10	10	1	10	1	10	10	10	10	10	10	8	6	1	10	3	183
<b>FZB42</b>	3	10	6	10	8	6	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	4	2	1	10	1	191



## 5. Discussió

---

Els resultats del primer assaig, en el medi V8 van mostrar a cada assaig soques amb efecte sobre la inhibició del miceli, per la soca EPS26 van ser: A128, A59, A132, A80, A151 i A17. Per la soca EPS157 les soques amb efecte de control del creixement van ser: A59, A164, A143, A69, A1, A128, A28, A132, FZB42, A17 i A91. En comú, hi va haver les soques: A128, A59, A132 i A17.

En el segon assaig, en la determinació del control de creixement, només en la segona repetició hi va haver efecte significatiu de les soques d'agent de biocontrol, les soques amb eficàcia de control van ser: A5, A1, A128, A17, A28, A55, A132, A164, A151 i A56. En el primer cas, els dos controls van mostrar eficàcia semblant a la dels agents de biocontrol, només en el segon cas, el control amb aigua i el control amb LB van mostrar una diferència. Sobre el control de l' esporulació, en el mateix assaig, es va veure com el control amb LB va ser la 2na soca amb més esporulació, en canvi el control amb aigua va tenir menys esporulació, però no significativament diferents, les soques que van reduir el nombre de conidis de manera significativa van ser: A95, A28, A180, A69, A92, A94, A87, A100, A55, A143, A80 i A84. També en l'assaig de restes vegetals de perera es va observar que pel que fa a formació de pseudotecis no hi va haver una diferència significativa respecte el control amb LB, per tant no es va poder afirmar que l'aplicació d'agents de biocontrol va reduir la formació d'inòcul primari.

Tot i que es va tractar de fulles mortes, la quantitat d'espores per disc de fulla va ser elevada, tot i que els resultats s'esperaven amb una importància més destacada de la formació de pseudotecis que de conidis, aquest fet pot contribuir a més infeccions secundaries durant el període vegetatiu (Rossi et al. 2005).

En el tercer assaig, on es va seguir un procés homòleg al segon, tot i que es va utilitzar teixit viu, es van avaluar les 3 mateixes variables. Sobre la primera variable (creixement del miceli), hi va haver en la primera repetició 7 soques amb eficàcia de control i 1 a la segona, i van ser: A128, A164 (comú 1ra i 2na repetició), FZB42, A28 i A17. Referent a

l'esperulació en el mateix assaig, es van obtenir bons resultats de control, en la 1ra repetició totes les soques es van diferenciar del control LB significativament, si ens fixem detalladament amb els resultats, el control LB va obtenir una mitjana de 77.16 conidis per cada 2 discs i si ho comparem amb la mitjana obtinguda per els agents de biocontrol (9.04 conidis/ dos discs), obtindríem una reducció mitja del 88.28% en la producció d'inòcul secundari. En la segona repetició, totes les soques excepte la FZB42 i la A132 van mostrar diferències significatives amb el control LB, i van mostrar de mitjana una reducció de l'esperulació del 89.86%.

Pel que fa a la variable de producció de pseudotecis, els resultats van ser molt positius i semblants als de l'esperulació, totes les 8 soques van mostrar diferències significatives respecte el control CLB, aquest últim va tenir una mitjana per les 2 repeticions de 29 pseudotecis per cada dos discs, i els tractaments amb agent de biocontrol, de mitja tenien 2.76 pseudotecis per cada dos discs, així que la reducció d'inòcul primari es va situar per aquest assaig en un 90.65%, que va ser un valor semblant al de l'esperulació.

En els assajos mitjançant estratègies de control, calia determinar si l'aplicació dels agents de biocontrol en moments diferents del procés d'infecció del patogen aconseguien eficàcies de control més interessants. En aquests assajos es van avaluar les mateixes 3 variables que en els 2 assajos anteriors.

Les estratègies emprades van ser dues, curativa i preventiva, en l'estratègia curativa es van realitzar 2 formes de control, inoculant 3 dies després d'inici d'infecció i 1 dia després.

Pel que fa a l'estratègia curativa en la variable de creixement de miceli, es va mostrar com en la aplicació de *B. subtilis* 1 dies després de la infecció en la primera repetició no mostrava diferències significatives respecte el control CLB i en la segona repetició només la soca A128 va mostrar eficàcia de control significativament diferent al control amb LB. Observant els resultats de la mateixa variable però en l'aplicació de *B. subtilis* 3 dies post-inoculació del patogen, en la primera repetició les soques A28 i A128 van mostrar una reducció de creixement significativa respecte el control i en la segona repetició només va ser la soca A151. En el mateix assaig, en segon lloc es va avaluar la

esporulació del patogen, en els resultats de la aplicació 1 dia post-infecció, on totes les soques van mostrar una reducció significativa de l' esporulació de 65,5 conidis/disc en el CLB fins a una mitjana entre tractaments de 15,68 conidis/disc així que la reducció seria d'un 76,06%. En la segona repetició només 2 soques van aconseguir diferències significatives respecte el control LB, van ser la A59 i la A17, la seva reducció d' esporulació va ser de mitjana per les 2 soques del 67.36% respecte el control. En l'assaig curatiu de 3 dies post-infecció l' esporulació va ser reduïda per poques soques, en la 1ra repetició la A151 i la A132 i en la segona la A59, en el primer cas la reducció respecte el control va ser del 94.4% amb una mitjana de les 2 soques i en el segon cas del 80,8%, tot i així van ser poques soques les que van aconseguir reducció d' esporulació.

En el mateix assaig, la producció de pseudotecis va presentar resultats diversos, en les 2 repeticions d'1 dia post-infecció en un cas només el control amb aigua va mostrar diferència significativa i a banda cap soca va mostrar eficàcia respecte el control; i en el segon cas va obtenir el major nombre de pseudotecis en control amb aigua i les soques d'agent de biocontrol no es van diferenciar del control amb LB. Sobre els resultats de 3 dies post-infecció en pseudotecis, en la primera repetició cap soca va mostrar diferències amb el control i en la segona repetició la soca A28 va millorar l'eficàcia en un 89,69% respecte el control.

En alguns dels assajos d'estratègia curativa, el control amb aigua ha mostrat resultats fins i tot per sobre alguna soca d'agent de biocontrol en algun moment, el motiu és molt probable que sigui que el medi LB amb que s'inoculen els agents de biocontrol, afavoreixi també el patogen, tot i així en tractament a camp el medi es dilueix molt més, i per tant la referència sempre va ser el control CLB.

En els assajos d'estratègia preventiva, els resultats de la inhibició del miceli van ser els més eficaços, en les 2 repeticions els control no van inhibir el miceli mentre que la totalitat de les soques va mostrar inhibició en diferent grau i sempre diferenciat significativament del control. Pel que fa a la reducció d' esporulació, en la primera repetició 4 soques van millorar significativament l'eficàcia, la A164, A17, FZB42 i la A128, amb una reducció mitjana entre les soques i el control del 87.5%, en la segona

repetició la reducció va ser total, del 100%. Pel que fa a la formació de pseudotecis en la primera repetició només la soça A28 va reduir significativament la formació de pseudotecis en un 95.5%, en canvi en la segona repetició totes les soques van reduir de manera significativa la formació de pseudotecis, amb una mitjana entre totes les soques del 91,47%.

Comparant els resultats de les estratègies, tot i presentar resultats diversos, l'estratègia preventiva mostra millors resultats, especialment en inhibició de miceli i que posteriorment influeix en l'esperulació i la formació de pseudotecis. El fort control del miceli probablement va ser degut a que quan el patògen va intentar colonitzar els discs de fulla morta, l'agent de biocontrol ja els havia colonitzat i ja havia produït compostos tòxics pel fong.

Pels que fa a la variabilitat de resultats, fins i tot del mateix assaig, cal dir que per exemple la composició de la fulla té un efecte crucial en el creixement del patògen i la seva esperulació (De Ataide and Hegde, 1988; Rajani et al. 1991; Shi and Kuang, 1991) i per tant seria un factor més que pot modificar els resultats.

## 6. Conclusions

---

Les conclusions obtingudes han estat:

1. Els resultats obtinguts en els assajos de sobrecapa en comparació al de restes vegetals no han estat consistents, ja que hi ha hagut soques que en l'assaig sobrecapa han presentat un bon control del patogen mentre que en els assajos en restes vegetals no. Tot sembla indicar que en funció del medi o substrat on es desenvolupa l'agent de biocontrol i/o el patogen els resultats poden variar significativament.
2. Les soques de *B. subtilis* més eficaces en els assajos de sobrecapa han estat: : A59, A128 i A132. Tot i això En general hi ha hagut més altres soques que també han disminuït significativament el creixement del miceli d'*S. vesicarium* s'han diferenciat significativament del control que les citades.
3. En els assajos de restes vegetals, les soques *B. subtilis* que major eficàcia de control del patogen han mostrat han estat: A28, A55, A94 i A143. Tot i això hi ha hagut altres soques que també han controlat significativament el creixement del miceli d'*S. vesicarium*, així com l' esporulació i la formació de pseudotecis.
4. L'aplicació de les soques de *B. subtilis* (A164, A 59 i A 128) en teixit viu va mostrar un control eficaç de la malaltia i del patogen en totes les variables analitzades, cosa que pot permetre efectuar tractaments en el període de vegetació de la planta amb *B. subtilis*.

5. En general en els assajos on els agents de biocontrol s'han aplicats van aplicar amb una estratègia curativa, 1 dia o 3 dies després de l'inici de colonització del patògen, s'ha es va determinar determinar un baix control del creixement de miceli, de l' esporulació i formació de pseudotecis, d'*S. vesicarium*. Els resultats no van ser consistents i es varen determinar diferències entre repeticions de l'assaig de manera que, les soques que van aconseguir un bon control en una repetició difícilment repetien bons resultats en altres repeticions.
  
6. L'aplicació preventiva d'algunes soques de *B.subtilis* en restes vegetals va ser l'estratègia més eficaç en el control del patògen, especialment en reducció de miceli, però també en esporulació i formació de pseudotecis d'*S. vesicarium*. Així que seria molt important fer els tractaments amb els agents de biocontrol en les restes vegetals de perera del sòl, abans que el patògen colonitzi aquest nínxol ecològic. Les soques que van mostrar un major control van ser: A 128, A17, FZB42 i A164.
  
7. S'han observat diferències significatives en la capacitat de control d'*S. vesicarium* entre les diferents soques de *B. subtilis* utilitzades com agents de biocontrol. El nivell de control ha variat entre assajos. Tot i això a nivell global les soques que han mostrat un control més homogeni, en tots els assajos, i amb una efectivitat més alta van ser: A28, A128 i A59. Malgrat això hi va haver altres soques que també van mostrar diferències significatives amb el control.
  
8. S'ha determinat que la utilització en els controls de medi LB líquid en comparació a la utilització d'aigua afavoreix tant el creixement del patògen, com l' esporulació d'aquest com la formació de pseudotecis en menor grau, aquest resultat es indiferent del tipus d'assaig.

## 7. Bibliografia

---

- George N. Agrios, 1988. Plant Pathology. Academic Press, INC, San Diego, 3ra edició.
- de Jong, P., F and Heijne, B., 2008. Acta Horticulturae. Exclusion of the Inoculum Source of Brown Spot (*Stemphylium vesicarium*) 800:833-838
- Llorente, I., Vilardell, P., Moragrega, C., and Montesinos, E. 1995. Susceptibility of selected pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf. Plant disease 79:471-473
- Llorente, I., Vilardell, P., Bugiani, R., Gherardi, I., and Montesinos, E. 2000. Evaluation of BSPCast disease warning System reduced fungicide use programs for management of Brown spot of pear. Plant disease 84:631-637
- 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
- Llorente, I and Montesinos, E. 2004. Development and field evaluation of a model to estimate the maturity of pseudothecia of *Pleospora allii* on pear. Plant disease 88:215-219
- Llorente, I., Vilardell, A., Bugiani, R., Gherardi, I., and Montesinos, E. 2006. Infection potential of *Pleospora allii* and evaluation methods for reduction of the overwintering inoculum of Brown spot of pear. Plant disease 90:1511-1516

- Llorente, I and Montesinos, E. 2006. Brown spot of pear: An emerging disease of economic importance in Europe. *Plant disease* 90:1368
- Llorente, I., Moragrega, C., Ruz, L., Montesinos, E., 2011. An Update on control of Brown spot of pear. *Trees* 26:239-245
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Ophir, Y., Beer, Stephen V., 1996. Antagonism of select bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of Brown spot of pear under controlled environment conditions. *Phytopathology* 86:856-863
- Pal, K and B. Mc Spadden Gardener, 2006. Biological control of Plant Pathogens. The plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02, [www.aps.net](http://www.aps.net)
- Rodriguez, AFM., Palacios, IS., Molina, RT., Bernabe, JAR ., 2010. Distribution of Airborne Fungal Propagule Concentrations in an Irrigated cropland zone. *Journal of Phytopathology* 158:513-522
- Rossi, V., Patteri, E., Giosué, S., Bugiani, R., 2005. Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of Brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European journal of Plant Pathology* 111:361-370
- Rossi, V., E. Patteri, 2009. Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of Brown spot of pear, through application of *Trichoderma*-based products. *Biological control* 49:52-57



- Toselli, M., Marangoni, B., Malaguti, D, 2004. Use of soil-applied calcium chloride to reduce fire blight and brown spot susceptibility of pear. Sustainability of horticultural Systems in the 21st century, Acta horticulturae 639:301-305

## 8. Annexos

**Taula A1.** Resultat del procediment GLM global de l'anàlisi ANOVA en l'assaig de sobrecapa. En la primera part la variable dependent és el diàmetre d'inhibició del miceli.

	<b>Graus llibertat</b>	<b>Suma quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>Model</b>	30	7464.50397	248.8168	32.79	<.0001
<b>Error</b>	473	3588.70238	7.58711		
<b>Total</b>	503	11053.20635			
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.675325</b>				
<b>Paràmetre</b>	<b>Graus de llibertat</b>	<b>Suma de quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>tractament</b>	27	2999.873016	111.106408	14.64	<.0001
<b>medi</b>	1	140.388889	140.388889	18.50	<.0001
<b>temps</b>	2	4324.242063	2162.121032	284.97	<.0001

**Taula A2.** Resultat del procediment GLM global de l'anàlisi ANOVA en l'assaig de restes vegetals de perera. La variable dependent és el diàmetre del miceli (mm).

	<b>Graus llibertat</b>	<b>Suma quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>Model</b>	32	327.3036	10.2282	14.17	<.0001
<b>Error</b>	723				
<b>Total</b>	755	521.853148	0.7217886		
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.385445</b>				
<b>Paràmetre</b>	<b>Graus de llibertat</b>	<b>Suma de quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>experiment</b>	1	0.1145926	0.1145926	0.16	0.6904
<b>temps</b>	1	131.7254584	131.7254584	182.5	<.0001
<b>tractament</b>	30	195.4636091	6.5154536	9.03	<.0001

**Taula A3.** Resultat del procediment GLM global de l'anàlisi ANOVA en l'assaig de fulla de perera viva. En la primera part la variable dependent va ser el diàmetre de creixement del miceli.

	<b>Graus llibertat</b>	<b>Suma quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>Model</b>	12	123.7258929	10.3104911	23.35	<.0001
<b>Error</b>	267	117.8720982	0.4414685		
<b>Total</b>		279	241.5979911		
<b>R<sup>2</sup></b>	0.636				
<b>Paràmetre</b>	<b>Graus de llibertat</b>	<b>Suma de quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>experiment</b>	1	43.80558036	43.80558036	99.23	<.0001
<b>temps</b>	2	34.77544643	17.38772321	39.39	<.0001
<b>tractament</b>	9	45.14486607	5.01609623	11.36	<.0001

**Taula A4.** Resultat del procediment GLM global de l'anàlisi ANOVA en l'assaig d'estrategia curativa. En la primera part la variable dependent va ser el diàmetre de creixement del miceli.

	<b>Graus llibertat</b>	<b>Suma quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>Model</b>	11	572.1527778	52.0138889	52.8	<.0001
	348	342.3777778	0.9838442		
<b>Error</b>	359	914.5305556			
<b>Total</b>		279	241.5979911		
<b>Paràmetre</b>	<b>Graus de llibertat</b>	<b>Suma de quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>experiment</b>	1	386.4694444	386.4694444	392.8	<.0001
<b>estratègia</b>	1	153.4027778	153.4027778	155.9	<.0001
<b>tractament</b>	9	32.2805556	3.5867284	3.65	0.0002

**Taula A5.** Resultat del procediment GLM global de l'anàlisi ANOVA en l'assaig d'estratègia curativa. En la primera part la variable dependent va ser nº de conidis per cada disc de fulla.

	<b>Graus llibertat</b>	<b>Suma quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>Model</b>	11	156509.4865	14228.1351	21.07	<.0001
<b>Error</b>	139	93862.6857	675.2711		
<b>Total</b>		150	250372.1722		
<b>R2</b>	0.625107				
<b>Paràmetre</b>	<b>Graus de llibertat</b>	<b>Suma de quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>Experiment</b>	1	121894.8974	121894.8974	180.5	<.0001
<b>Estratègia</b>	1	20.7752	20.7752	0.03	0.8610
<b>Tractament</b>	9	34593.8139	3843.7571	5.69	<.0001

**Taula A6.** Resultat del procediment GLM global de l'anàlisi ANOVA en l'assaig d'estratègia preventiva. La variable dependent és l'halo d'inhibició.

	<b>Graus llibertat</b>	<b>Suma quadrats</b>	<b>Mitjana quadrats</b>	<b>F Valors</b>	<b>Probabilitat &gt; F</b>
<b>Model</b>	10	48.4030115	4.8403011	11.13	<.0001
<b>Error</b>	188	81.7336720	0.4347536		
<b>Total</b>	198	130.1366834			
<b>R<sup>2</sup></b>					
<b>0.371</b>					