

ÍNDEX	1
RESUM	4
AGRAÏMENTS	6
INTRODUCCIÓ	7
1. La malaltia i la seva simptomatologia	7
2. L'agent causant de la malaltia	8
3. Cicle de la malaltia i epidemiologia	9
4. Mètodes de control de l'estemfiliosi.	10
4.1 Control de la fase sexual (<i>Pleospora allii</i>)	10
4.2 Control de la fase asexual (<i>Stemphylium vesicarium</i>)	11
5. Efecte de les condicions ambientals en l'esperulació i alliberació	12
5.1 Esperulació en altres fongs	13
OBJECTIUS	14

MATERIALS I MÈTODES	15
1. MÈTODES GENERALS	15
1.1 Preparació del medi de cultiu	15
1.2 Preparació de l'inòcul d' <i>S. vesicarium</i>	15
1.3 Material vegetal	16
2. AVALUACIÓ DE DIFERENTS MÈTODES D'EXTRACCIÓ DE CONIDIS D'<i>S. vesicarium</i>	16
2.1 Assaig A. Extracció de conidis a partir de colònies d' <i>S. vesicarium</i> crescudes en medi V8.	16
2.2 Assaig B. Extracció de conidis a partir de colònies crescudes en fulles de perera	18
2.3 Recompte de conidis	19
3. EFECTE DE LA TEMPERATURA, LA HUMITAT RELATIVA I LA HUMECTACIÓ D'<i>S. vesicarium</i>	20
3.1 Inoculació del patogen	21
3.2 Preparació de sals per obtenir les humitats relatives	22
3.3 Inducció de l'esporulació	24
3.4 Extracció de conidis	26

3.5	Anàlisi estadístic de les dades	27
RESULTATS		28
1	<i>AVALUACIÓ DE DIFERENTS MÈTODES D'EXTRACCIÓ DE CONIDIS D'S.vesicarium</i>	28
2	<i>EFFECTE DE LA TEMPERATURA, LA HUMITAT RELATIVA I LA HUMECTACIÓ D'S.vesicarium</i>	29
2.1	Primer assaig	29
2.2	Segon assaig	35
2.2.1	Segon assaig A.	36
2.2.2	Segon assaig B.	40
DISCUSSIÓ		42
CONCLUSIONS		44
BIBLIOGRAFIA		45

RESUM

L'estemfiliosi de la perera és una de les malalties de major importància econòmica en determinades zones fructícoles europees, ocasionant pèrdues del 80-90% de la producció en aquestes zones. Els danys es poden apreciar tant en les fulles com en els fruits i poden causar la seva caiguda o depreciació econòmica. És una malaltia provocada per un fong deuteromicet anomenat *Stemphylium vesicarium*. El seu cicle biològic es diferencia en dues etapes segons la fase reproductiva que tingui, una etapa primera asexual que ve donada per *S.vesicarium* (Wallr.) E. Simmons i una segona etapa sexual que ve donada per *Pleospora allii* (Rabenh) Ces&De Not. Aquest estudi es va centrar en la fase asexual, bàsicament les condicions d'esperulació i la posterior formació de conidis.

Per tal de reduir aquesta malaltia, i sobretot el número de tractaments químics per el seu control, és necessari conèixer el moment en què es produirà l'esperulació. A més reduir la quantitat d'inòcul secundari, pot ampliar la disminució de la intensitat de la malaltia.

Amb l'objectiu de conèixer els factors ambientals relacionats amb l'esperulació de conidis d'*S.vesicarium* es van realitzar una sèrie d'assajos per determinar l'efecte de la temperatura, humitat relativa i la temperatura sota condicions d'humectació en la formació de conidis d'*S.vesicarium*. Els assajos es van realitzar a nivell de laboratori per veure el desenvolupament d'*S.vesicarium* sota condicions ambientals controlades de temperatura i humitat relativa al llarg d'un període de 28 dies d'incubació per assaig (primer assaig i segon assaig).

Primerament es va posar apunt un mètode d'extracció i quantificació de conidis d'*S.vesicarium*. Es van avaluar quatre mètodes (Agitació, microagitació, rotació i homogeneïtzació). El mètode d'extracció més eficaç va ser el mètode de la homogeneïtzació mitjançant el Politró (PT-MR 3000).

En el primer assaig es va procedir a determinar l'efecte de la temperatura (5,10,15,20 i 27°C) i humitat relativa (60,80,88,96,98 i 100%) en la producció de conidis d'*S.vesicarium*. Es va realitzar amb fulles de perera de la varietat conference (3 discs de fulla per cada tub) i es va avaluar la producció de conidis/cm² de fulla cada 7 dies durant 4 setmanes (7,14,20 i 28 dies). Aquest assaig va servir per posar apunt el mètode ja que els resultats obtinguts no van ser significatius. Es van fer dos repeticions amb l'única diferència que en la segona només es van avaluar 4 humitats relatives (60,88,96 i 100%).

En el segon assaig A les condicions assajades de temperatura van ser (5,10,15,22'5 i 27°C) i les humitats relatives van ser les mateixes que en el primer assaig. Aquest assaig a diferència del primer assaig es va avaluar només als 28 dies de la seva inoculació i es va determinar que sota humitats relatives entre 80 i 100% la temperatura òptima per la producció de conidis, va ser de 15°C .

I en el segon assaig B es va determinar l'efecte de la temperatura (5,10,15,22'5 i 27°C) en condicions d'humectació, es va observar que la temperatura òptima era de 22'5°C .

AGRAÏMENTS

La realització d'aquest Treball Final de Carrera no hagués estat possible sense l'ajuda d'una sèrie d'organismes i persones. Amb tot això m'agradaria donar les gràcies:

- A l' Institut de Tecnologia agroalimentària (INTEA) i a la Universitat de Girona sobretot al Centre d'innovació i desenvolupament en sanitat vegetal (CISDAV), per facilitar-me el material i les instal·lacions per els diferents assaigs realitzats. Aquest treball s'ha desenvolupat en el marc del projecte AGL2006-04987/AGR.
- Al Dr. Isidre Llorente Cabratosa, t'agraeixo molt la tasca de direcció realitzada, moltes gràcies per la teva disponibilitat, paciència i amabilitat.
- A la meva mare i al meu pare, que després de tant de temps al final, potser, estaran una miqueta orgullosos de mi. Moltes gràcies per tot i fer-me tal com sóc.
- A tota la meva família, al meu germà i als meus amics per confiar sempre amb mi i ajudar-me en tot moment.
- A la Meritxell Pujol per estar sempre amb mi i fer-me ser feliç.
- I sobretot a l'Albert Vilardell, que sense la seva ajuda hagués resultat impossible la realització d'aquest treball. Gràcies per la teva companyia de laboratori i per ser com ets. No vull oblidar-me de la Gemma Santamaria i la Concepció Moragrega, moltes gràcies.

INTRODUCCIÓ

1.-La malaltia i la seva simptomatologia

L' estemfiliosi és una malaltia d' origen fúngic molt important de la perera, i està localitzada a tota la zona mediterrània d' Europa.

Va ser observada per primera vegada l'any 1937 a Itàlia, pel professor Mezzeti, en diferents varietats de pera (Cavanni et Ponti,1994) però no va ser fins l'any 1975 a la regió d'Emilia Romagna i a Veneto al nord d'Itàlia (Ponti et al., 1982) on es va detectar de manera oficial. La malaltia progressivament va continuar per tota la costa mediterrània; es va observar al sud de França (Allard et Blancard,1989) i després a Girona (Vilardell et al., 1988). Va començar a ser un important problema fitopatològic als anys vuitanta.

A Catalunya rep el nom de “ taca bruna” o estemfiliosi de la perera i es va observar per primera vegada a Girona l'any 1984, a Lleida s'hi va detectar el 1988, estenent-se posteriorment per l'Aragó, La Rioja, Euskadi i Extremadura (Vilardell et al., 1988; de la Cruz et al., 1997). Actualment s'ha extès a Holanda i Bèlgica i també a Portugal (Montesinos et Llorente, 2002) . Es considerada de les malalties més greus dins el cultiu de la perera juntament amb el foc bacterià (Montesinos et al, 2000), a part d'afectar la perera també ataca altres cultius com l'all, ceba, espàrrecs i d'altres espècies vegetals (Prados- Ligeró et al.,2003).

El seu nom fa referència a la simptomatologia present en fulles i fruits.

En funció de la varietat de la perera, de la zona i de l' any té un efecte o un altre. Comença amb atacs lleugers i s'incrementa al llarg dels anys, arribant a produir la pèrdua del 80 -90% de la producció de fruita si no s'apliquen estratègies de control (Vilardell et al.,1988).

A més les pèrdues de producció poden ser molt elevades si les condicions climàtiques són les òptimes per la infecció; períodes d'humectació llargs i temperatures elevades són les principals variables climàtiques que afecten a la severitat d'aquesta malaltia (Montesinos et al., 1995).

La incidència de la malaltia varia en funció de la sensibilitat de la varietat i de l'estadi de maduració del fruit.

Els símptomes es manifesten en fruits, fulles i brots tendres de les varietats sensibles de perera. Aquests símptomes apareixen a finals d'abril amb petites taques necròtiques de forma circular a les fulles tendres, i al juny ja poden ocupar tot el limbe foliar i afectar al pecíol provocant una defoliació anticipada. Els símptomes als fruits apareixen a finals de Maig principis de Juny (Montesinos et al., 1996; Ponti et al., 1982) i poden aparèixer sense que abans s'hagi apreciat cap símptoma a les fulles.

Les taques necròtiques que s'aprecien en els fruits són produïdes per una necrotoxina sintetitzada pel fong (Ponti et al., 1982).

Les lesions es poden produir durant tot el cicle vegetatiu, però els fruits immadurs són més sensibles que els madurs i els òrgans joves són més sensibles que els adults (Montesinos et al., 1996).

Al principi les lesions són seques, dures, circulars i limitades a la zona epidèrmica , però a mesura que el fruit madura les lesions van creixent, es tornen toves i penetren a l'interior del mesocarp. Els fruits afectats per *Stemphylium* i que romanen a l'arbre no tenen valor comercial, i quan estan molt afectats cauen al terra essent la principal font d'inòcul (Montesinos et al., 1996).

Les varietats cultivades ofereixen diferents nivells de sensibilitat (Montesinos et col., 1996). Són altament susceptibles : Passe Crassane, Alexandrine, Conference, Doyenne du Comice, Duc de Bordeaux, Abate Fetel i General Leclerc, essent les varietats més comercialitzades.

Mentre que els cultivars de Williams, Blanquilla, Beuvre-Hardy, Louis Bonne, Grand Champion i Highland són poc o gens susceptibles enfront l'estemfiliosi.

2.- L'agent causant de la malaltia

L' agent causant de la taca bruna de la perera és el fong *Stemphylium vesicarium* , un fong Deuteromicet dels anomenats fongs imperfectes.

Aquest patogen presenta dos fases diferenciades, una fase sexual, en què el passa en forma de *Pleospora allii* (Ascomicet), és sapròfita i es produeix en condicions adverses i una asexual corresponent a *S.vesicarium*, essent la fase que realitza les interaccions amb la planta, constitueix la fase infectiva i és la que ocasiona les pèrdues econòmiques.

Pleospora allii correspon a la etapa perfecte del fong que apareix durant la fase hivernal, en les fulles infectades o fruits que resten en el sòl de la plantació, en forma de cossos fructífers (pseudotecis). Els pseudotecis són una estructura més o menys tancada, de color negre i de forma lobular de 0,1 – 0,5 mm. de diàmetre, que en el seu interior s'hi desenvolupen els asc. Els asc madurs són cilíndrics i amb forma de porra de (90-250 x 20-50 µm), en l'interior de les quals s'hi troben 8 ascòspores de forma elipsoidal-ovalada, de color marró clar, amb septes i amb unes mides de (26-50 x 10-20 µm) (Ponti et al., 1982; Bassallote et al., 1996)(**Fig. 1**).



Fig.1. Ascòspores de *Pleospora allii* en l'interior dels asc .

La fase asexual està caracteritzada per la producció de conidis (espores produïdes genèticament iguals com a resultat d'un procés asexual) per part dels conidiòfors.

Els conidiòfors tenen aspecte cilíndric, són de color marró i presenten septes, no ramificats que emergeixen del estroma.

Els conidis presenten una forma ovalada, són pluricel·lulars i de color marró, amb d'un a tres septes transversals i d'un a quatre septes longitudinals, amb una constricció central i la paret exterior de superfície rugosa (Ponti et Cavanni, 1982) (**Fig. 2**). La mida dels conidis oscil·la entre (22-40 x 10-22 μm) amb una relació longitud- amplada de 1,5-3, aspecte que diferencia *S. vesicarium* d'altres espècies d' *Stemphylium* (Bassallote et col., 1996).



Fig.2. Conidi observat al microscopi òptic

3.- Cicle de la malaltia i epidemiologia

El cicle biològic consta de dos etapes, com s'ha descrit anteriorment.

El cicle s'inicia a la tardor, amb la caiguda de les fulles i fruits infectats, on s'observa un miceli sapròfit que produeix pseudotecis, cossos fructífers que actuen com a mecanismes de defensa enfront a la presència de condicions desfavorables per al creixement del propi patogen, immers parcialment en el teixit de l'hoste.

Durant l'hivern, en funció de la temperatura i de la humitat relativa, en l'interior dels pseudotecis es produeix la maduració i formació dels ascis més o menys ràpidament. A finals d'hivern, principis de primavera, quan les condicions són òptimes (març- abril) s'observen la majoria d'ascis ja madurs amb les ascòspores apunt de ser alliberades. Les quals produiran les infeccions primàries (Llorente et al., 2000; Rossi et al., 2005). Aquestes es dispersen per mitjà del vent i per les gotes de la pluja cap altres plantes susceptibles (Montesinos et al., 1995).

Les infeccions s'inicien a través de les obertures naturals, en les fulles pels estomes i en els fruits per les lenticel·les (Montesinos et al., 1996). Després de períodes d'humectació llargs s'obté l'alliberació màxima de conidis.

La germinació dels conidis es produeix amb l'existència d'aigua disponible en l'entorn o una humitat relativa molt alta ($\geq 95\%$) i d'un rang de temperatures entre 15 -30°C (Montesinos et Vilardell, 1992). La temperatura òptima per a la germinació dels conidis d' *Stemphylium vesicarium* és de 28°C (Montesinos et Vilardell, 1992), aconseguint un 50% de la germinació en només 60 minuts. Aquesta velocitat de germinació explica la rapidesa en què un arbre es pot veure afectat per aquesta malaltia (Llorente, 1997).

En general, cada conidi genera entre 3-6 tubs germinatius (espores polispermiques) (Montesinos et al., 2000).

En el procés de germinació es produeixen toxines com l'estemfilina, responsables dels símptomes de la malaltia i presenten diferent grau de toxicitat depenent de la varietat i de l'hoste (Montesinos et al., 2000).

A partir d'estudis realitzats tant en ambient controlat com en assajos i observació a camp, s'ha determinat que les condicions òptimes per a la infecció són de més de 10 hores d'humectació i temperatures entre 15-25°C a més de tenir una elevada humitat relativa. A partir de la infecció i dins un rang de temperatures òptimes (22-26°C.) al cap de 5 dies ja s'observen els símptomes.

Les fulles i fruits infectats que cauen al terra constitueixen l'inòcul primari per al següent cicle de la malaltia (Montesinos et Vilardell, 1992 ; Llorente et al., 2000, Llorente i Montesinos, 2002).

4.- Mètodes de control de l'estemfiliosi

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

4.1. Control de la fase sexual (*Pleospora allii*)

Considerada la fase de reservori de la malaltia durant l'hivern. El fong es troba en forma de *Pleospora allii*, aquesta es troba en fulles i fruits localitzats en forma de pseudotecis.

Els mètodes que es realitzaran aniran centrats a reduir la font d'inòcul, fulles i fruits infectats que es troben en el terra, per tal d'eliminar les infeccions primàries i disminuir el nivell de malaltia.

Es poden realitzar pràctiques culturals per reduir l'inòcul primari; si els danys van ser elevats en anys anteriors es retiraran les restes de fulles i fruits dipositats en el terra per eliminar el reservori o part d'aquest, també es pot procedir al trinxat de les fulles caigudes aconseguint una descomposició més ràpida.

A més s'utilitzen pràctiques biològiques, es treballa amb organismes vius per poder reduir la població del patogen i disminuir la font d'inòcul; s'han fet assajos amb relativa eficàcia amb alguns productes comercials a base del fong *Trichoderma spp.*, amb l'objectiu de disminuir el reservori (Parrón, 2000; Llorente et al., 2006). L'inconvenient d'aquests mètodes biològics és que es treballa amb organismes vius i tenen una durabilitat limitada de vida i unes condicions ambientals molt particulars per desenvolupar-se.

Es poden aplicar fungicides a la tardor, normalment amb components derivats de l'urea, per reduir el reservori d'inòcul a l'hivern (Canestrà et al., 1988), tot i que altres estudis han determinat una baixa eficàcia d'aquests productes (Parrón 2000 ; Llorente et al., 2006).

4.2. Control de la fase asexual (*Stemphylium vesicarium*)

Intentar durant el període vegetatiu, primavera i estiu, el desenvolupament mínim d'infeccions secundàries, provocades per *Stemphylium vesicarium*.

Per evitar la propagació ràpida de la malaltia, degut a la gran diferència de sensibilitat a *S.vesicarium* entre les diferents varietats de perera, plantar varietats amb poca sensibilitat a la malaltia (Cavanni et Ponti, 1994). Evitar el reg per aspersió ja que amb aquest reg s'aconsegueix una humectació en la superfície de les fulles, superior als altres mètodes de reg (Brunelli et al.,1983).

Per la prevenció i control de la malaltia s'utilitzen fungicides; els més eficaços són els ditiocarbamats com el TMTD i mancozeb aplicats un cop a la setmana, alternats amb dicarboximides i estrobirulines cada quinze dies (Brunelli et col., 1986; Vilardell ,1988). No existeix cap fungicida curatiu i l'activitat post infecció es nula amb els que són eficaços en tractaments preventius. El problema dels fungicides, és l'elevat número de tractaments que s'han de dur a terme i el que això comporta (deposicions de residus en plantes, fruits, sòl i nivells freàtics, perjudicant la salut humana i el medi ambient).

El coneixement de l'efecte dels factors ambientals, de l'hoste i el potencial d'inòcul, ha permès construir un model de predicció del risc d'infecció anomenat BSPcast. Aquest model relaciona la severitat de la malaltia amb les hores d'humectació i les temperatures mitjanes del període d'humectació (Montesinos et al., 1995). El model determina també en quin moment les condicions són favorables per a l'aparició d'infeccions provocades per *S.vesicarium*. El fet que es pugui predir en quin moment es pot començar a desenvolupar la malaltia i determinar les dates d'aplicació fitosanitàries pel control de *S.vesicarium* permet un estalvi considerable en l'aplicació de fungicides químics. Els resultats observats han estat que el nivell de la malaltia no difereix significativament entre el tractament preventiu i el guiat, però s'aconsegueix un estalvi entre el 26-50 % de les aplicacions de fungicides (Llorente et al.,2000). L'eficiència del model BSPcast pot millorar amb la informació de les previsions del nivell d'inòcul present i de la sensibilitat dels estadis fenològics i de la varietat de la pera cultivada (Llorente et al.,1999). El desenvolupament de la infecció s'ha comprovat que es veu afectat pels períodes discontinus d'humectació, fet que pot disminuir encara més les aplicacions del producte fungicida utilitzat (Llorente et Montesinos,2002). Conèixer el moment en què s'està produint l' inòcul incrementa l'eficiència del BSPcast. Per tant conèixer les condicions òptimes d' esporulació (formació de conidis) i posterior alliberació, permetrà determinar la quantitat d'inòcul disponible i el moment en què es produirà, reduint encara més el número de tractaments a realitzar.

5.- Efecte de les condicions ambientals en l' esporulació i alliberació.

L' inici de la malaltia depèn tant dels factors ambientals, com de la susceptibilitat de l'hoste receptor com de la infectivitat del patogen (Montesinos et al., 1995).

Els factors climàtics com la temperatura, la precipitació, la humectació, la llum i el vent són decisius per l'alliberació i transport dels fongs (McHardy, 1996; Bassallote et al., 1999).

L' alliberació de conidis varia molt d'un any a l'altre i estudis previs han relacionat l' esporulació de *S.vesicarium* en relació a paràmetres ambientals com la humitat relativa, la temperatura i la precipitació (Prados- Ligeró et al., 2002).

Hi ha una relació significativa entre els moments màxims de concentracions d' espores i els dies amb condicions climàtiques favorables. Considerant les condicions de temps favorable per a la producció de conidis (temperatures entre 15 i 25°C i períodes d'humectació superiors a les 10 hores) (Rossi et al.,2005).

Dies consecutius amb condicions de temps favorable produeixen un increment en la concentració de conidis en l'aire, assolint el màxim en pocs dies i després disminuint progressivament (Rossi et al.,2005).

Els dos factors climàtics més importants que afecten a la severitat són la disponibilitat d'aigua en la superfície dels òrgans susceptibles de la perera i la temperatura. La temperatura òptima per produir la infecció és entre (20-25°C). A més són dos factors que influeixen en els processos de germinació (Montesinos et al., 1995).

La temperatura és molt important per tal d'obtenir unes condicions òptimes pel desenvolupament del patogen, ja que aquest necessita d'unes determinades temperatures mínimes. Els moments òptims d' esporulació d'alguns fongs, té lloc en períodes curts d'humitat amb elevades temperatures (MacHardy, 1996; Bassallote et al.,1996).

La humectació deguda moltes vegades a les precipitacions en forma de pluja o a les condensacions, es un altre factor decisiu, ja que es el responsable de l' inici de l'alliberació d'ascòspores de *Pleospora allii*. L' increment de la concentració d'espores en l'aire està relacionada amb la reducció de la humitat relativa i l' humitat donada després de les 8h. del matí (Rossi, 2005). A la nit una elevada humitat relativa afavoreix l' esporulació, però poques espores són alliberades, a causa de la velocitat relativament baixa del vent i pels efectes de tensió- superfície de la gebrada (Rossi et al., 2005).

La llum té un efecte important en el moment d'alliberació i producció de les ascòspores o conidis. La concentració de conidis més elevada d' *S.vesicarium* es produeix entre les 10-14h. , mentre que a la nit (foscor) s'observa la menor presència de conidis (Rossi et al., 2005).

El vent actua com a mecanisme de dispersió d'espores. Durant el matí o tarda, si augmenta la velocitat del vent, incrementarà el número de conidis madurs que seran alliberats fins que disminueixi la velocitat del vent (Rossi et al., 2005).

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

5.1.- Esporulació en altres fongs

L' esporulació és la producció de cèl·lules reproductores especialitzades que germinen originant un tub germinal que desenvoluparà el micel·li.

En *Stemphylium vesicarium* s'ha vist que tant la temperatura, com el temps, la humitat relativa i sobretot la humectació influeixen en l' esporulació i alliberació de conidis. La temperatura òptima per l' esporulació en condicions ambientals no controlades, s'ha determinat que és entre 15-25°C i una elevada humitat, particularment períodes d' humectació superiors a les 10 hores (Rosssi et al.,2005). La influència d'aquests paràmetres en l' esporulació d'altres fongs, a vegades coincideix i a vegades difereix.

La HR és el factor menys variable, ja que la gran majoria de fongs necessiten només d'una HR molt elevada per esporular. La única diferència es que en alguns fongs per esporular necessiten intercalar HR altes amb HR baixes, com el fong *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* (Arthur et Thomas , 2001).

Un factor més variable és la temperatura, hi ha fongs que necessiten temperatures més elevades com *Lasiodiplodia theobromae* que té el seu òptim d' esporulació a 35° (Khanzada, 2006), mentre que n'hi ha d'altres que les necessiten més baixes com *Botrytis cinerea* en fulles de maduixa que té un òptim d' esporulació entre 17-18°C (Sosa-Alvarez M. et al.,1995). Però la gran majoria coincideixen bastant, com *Pyrenophora semeniperda*, òptim d' esporulació 20°C (Campbell et al.,1996).

L'últim factor és la humectació, coincideix en gairebé tots els fongs. Períodes d' humectació superiors a les 16 hores produeixen la màxima esporulació com en *Phomopsis amygdali* (Lalancette et al.,2003) i amb períodes superiors a les 24 hores augmenta la incidència de la malaltia com en *Colleotrichum orbiculare* (Monroe et al.,1997).

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball és determinar les condicions favorables per la formació de conidis de *S.vesicarium*. Per assolir l'objectiu es va :

- Determinar el mètode d'extracció de conidis més eficaç.
- Determinar l'efecte de la temperatura i humitat relativa en la producció de conidis d'*S.vesicarium*
- Determinar l'efecte de la temperatura amb humectació en la producció de conidis d'*S.vesicarium*.

MATERIALS I MÈTODES

1.MÈTODES GENERALS

1.1.PREPARACIÓ DEL MEDI DE CULTIU

El medi de cultiu que es va utilitzar és a base de concentrat de tomata (V8 salsa de vuit vegetals), carbonat càlcic, agar i aigua destil·lada, i es va ajustar el pH entre 6'5 i 7'5. Per homogeneïtzar el medi, es van pesar els volums de cada component i es van introduir en tres vasos de precipitats, col·locant-los al agitador magnètic, afegint -li l'aigua molt a poc a poc. Una vegada estaven ben barrejats es van posar al autoclau selecta AUTESTER-E (140 l.) (Fig.3), d' on en va sortir el medi estèril, i va passar de fase líquida a sòlida. L' autoclau va treballar durant 20 minuts a 121°C i a 1'1 atm. de pressió..



Fig.3.Autoclau selecta AUTESTER-E

1.2.PREPARACIÓ DE L'INÒCUL D'*S. vesicarium*

Es va utilitzar la soca virulenta de *S.vesicarium* EPS-26, del socari del grup de Patologia Vegetal (INTEA) de la Universitat de Girona.

Una vegada les plaques Petri van tenir el medi, es va sembrar el fong, i es van posar a incubar a una temperatura de 20°C amb un fotoperíode de 16 hores de llum i 8 hores de foscor. Al cap de 10 dies es va fer la preparació del inòcul. La preparació del inòcul es va fer amb un raspall de la superfície de les plaques incubades, amb colònies d'*S.vesicarium*, amb l'ajuda d'aigua destil·lada freda i uns cotonets per tal de separar els conidis del medi aquós, es va utilitzar també un tamís prèviament esterilitzat d' una llum de 0'2mm per permetre únicament el pas

dels conidis .Tot el procés es va realitzar a una temperatura inferior a 5°C per tal d'impedir que el conidi formés el tub germinatiu.

Es va obtenir una suspensió de $1'6 \times 10^5$ conidis / ml., determinada a partir d'una cambra hematocimètrica tipus Thoma.

A partir d' aquesta suspensió obtinguda es va procedir a la inoculació del patogen.

1.3.MATERIAL VEGETAL

El material vegetal emprat va ser de la varietat de perera Conference, obtingut per micropropagació (Agromillora Catalana,S.A.,Barcelona), autoarrelat ,clonat i mantingut en l' hivernacle experimental de l' Escola Politècnica Superior de la Universitat de Girona.

És una varietat molt sensible a aquesta malaltia i alhora molt interessant per les seves característiques de ràpida i fàcil entrada en producció,qualitat i conservació (Iglesias et al.,2003).

2.AVALUACIÓ DE DIFERENTS MÈTODES D'EXTRACCIÓ DE CONIDIS D'S. vesicarium.

Per a determinar el número de conidis, existeixen diferents mètodes d'extracció en diferents fongs, però només el mètode de la rotació ha estat provat amb *S. vesicarium* (Rosi *et al*, 2005).

Un dels principals inconvenients per el recompte de conidis d'*S.vesicarium*, és aconseguir extreure tots els conidis presents en la colònia fúngica. Per aquesta raó i per optimitzar l'extracció de conidis es van realitzar dos assajos, comparant quatre mètodes d'extracció.

2.1.Assaig A. Extracció de conidis a partir de colònies d' *S.vesicarium* crescudes en medi V8.

En aquest assaig es van comparar tres mètodes d'extracció : La rotació, l'agitació i la microagitació.

La rotació és un mètode que consisteix en posar un tub de propilè al vòrtex (**Fig.4A**), aparell el qual permet remoure la solució amb un ràpid moviment de rotació que tendeix a formar un buit en el seu centre.

El mètode de l'agitació realitzada per l'agitador orbital digital IKA KS 501 digital (**Fig.4B**), fa que el moviment es distribueixi uniformement per totes les mostres mitjançant un mecanisme de motor excèntric amb contrapesos. Està compost d'una safata d'agitació amb quatre barres metàl·liques envoltades amb espuma que es fixen en funció de les mides dels recipients. I el mètode de la microagitació, realitzada per l'ultrasons LABSONIC U B BRAUN 2000 U (**Fig.4C**), que és un aparell molt eficaç en l'homogenització, dispersió, extracció i divisió de cèl·lules d'una mostra.

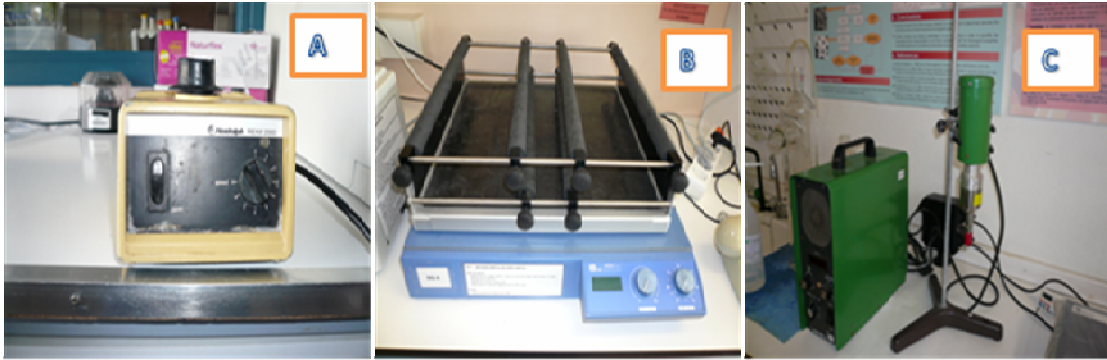


Fig.4. Aparells emprats en els mètodes d'extracció de conidis avaluats : **A.**Vòrtex, per la rotació, **B.**Agitador orbital digital, per l'agitació i **C.**Ultrasons, pel mètode de la microagitació.

Per a determinar l'eficàcia d'aquests mètodes es va sembrar la soca virulenta d' *Stemphylium vesicarium* EPS-26 en 3 plaques Petri amb medi V8 (Dhingra et Sinclair, 1987) (procediment descrit amb anterioritat). Es van posar a incubar durant 15 dies a una temperatura de 22'5°C. Després es van extreure de cada placa els discs d'agar d'1.3 cm² amb colònies del fong crescudes i esporulades, els quals es van dipositar individualment en tubs de propilè de 20 ml amb 1.5 ml d'aigua estèril (**Fig.5**).

Es van processar les mostres pels tres mètodes emprats segons les condicions fixades en la **Taula 1** ;pel mètode de la rotació es van utilitzar 4 tubs, un dels quals se li va afegir 5µl de tween (solució que ajuda a dispersar els conidis) , els 4 tubs es van posar durant 3 minuts al vòrtex i es va procedir al recompte directe de conidis. A l'agitador orbital digital és van utilitzar 18 tubs, els quals es van processar a una velocitat de 150 i 300 r.p.m. durant 1, 3 i 5 minuts (es van utilitzar tres tubs per cada temps i velocitat), mentre que pel mètode de la microagitació es van emprar 9 tubs, es van assajar 3 tubs per cada interval de temps (1,3 i 5 minuts) i a la velocitat màxima.



Fig.5. Tubs de propil.lè amb el seu disc d'agar.

Taula.1. Característiques dels diferents mètodes utilitzats per avaluar l'eficàcia en l'extracció de conidis a partir de colònies del fong crescudes en medi V8.

MÈTODE	Agitació	Vortejat	Ultrasons
APARELL	Agitador orbital IKA KS 501 digital	Vòrtex.Heidolph REAX 2000	Ultrasons LABSONIC.BRAUN 2000 U
VELOCITAT/ FREQUÈNCIA	150 i 300 r.p.m	50 Hz	50-60 Hz
TEMPS PROCESSAMENT	DE 1, 3 i 5 minuts	3 minuts	1, 3 i 5 minuts

Es va observar que en cap dels tres mètodes s'aconseguien alliberar totalment els conidis i que alguns d'aquests continuaven adherits al medi, per això es va procedir a la realització d'un segon assaig utilitzant fulles de perera en comptes de medi artificial.

Per tant es va procedir a un nou assaig.

2.2. Assaig B. Extracció de conidis a partir de colònies crescudes en fulles de perera.

En aquest assaig es van comparar quatre mètodes : Agitació, rotació, microagitació i homogeneïtzació. El mètode de la homogeneïtzació, format pel politró (Fig.6) es un mètode d'extracció que destrueix la mostra, produint una homogeneïtzació i dispersió molt important. Es va seguir la metodologia abans descrita, amb les diferències que, en aquest assaig es van introduir 3 discs a cada tub i que aquesta vegada es van extreure els discs de fulles de perera Conference d'1'3 cm² completament colonitzats pel fong . Aquests discs es van obtenir després de tres dies d'incubació a 22'5°C i de la prèvia inoculació amb la suspensió de conidis. A cada disc de fulla se li va inocular 20µl de la suspensió de 1'6x10⁵ ufc / ml.

Es van processar les mostres pels 4 mètodes triats segons les condicions fixades en la **Taula 2** i es van inocular 60 discs, distribuïts en 4 lots pels diferents mètodes d'extracció (per cada mètode es van emprar 5 tubs i a cada tub s'hi van introduir tres discs). En el mètode de l'agitació es van fer dos repeticions, en la primera es van usar tres tubs a 150 r.p.m i durant 20 minuts, mentre que en la segona repetició es van emprar dos tubs a 300 r.p.m, i també durant 20 minuts. En la rotació es van usar 5 tubs, es va utilitzar 1 tub durant l' interval de temps mínim, 1 minut i es van emprar 2 tubs per els intervals de temps de 3 i 5 minuts, les tres metodologies emprades es van realitzar a una mateixa velocitat. En la homogeneïtzació es va procedir a l'observació de 5 tubs a una velocitat de 7000 r.p.m durant 3 minuts i finalment en el mètode de la microagitació es van utilitzar 5 tubs a velocitat màxima i durant 10 minuts.



Fig.6. Aparell utilitzat en el mètode d'homogeneïtzació mitjançant el politró (PT-MR 3000).

Taula 2: Característiques dels diferents mètodes utilitzats per avaluar l'eficàcia en l'extracció de conidis a partir de colònies del fong crescudes en fulles de perera.

Mètode	Agitació	Vortejat	Politronat	Ultrasons
Aparell	Agitador orbital IKA.KS501 digital	Vòrtex Genie2	Polytron.PT- MR 3000	Ultrasons LABSONIC.BRAUN 2000 U
Velocitat/ Freqüència	300 i 150 r.p.m	50 Hz	7000 r.p.m	50-60 Hz
Temps de processament	20 min	1, 3 i 5 min	3 min	10 min

2.3.Recompte de conidis.

Una vegada processades les mostres amb els diferents mètodes d'extracció es va procedir a realitzar un recompte directe de conidis amb la lupa binocular (Nikon 2000). Mitjançant una pipeta es van extreure de cada tub 4 gotes de 5 µl cada una de les quals es van dipositar en un portaobjectes (**Fig.7**). Es va ajustar el camp de visió de manera que s'observava tota la superfície de la gota. Es va comptar el número total de conidis en tota la gota. Es va realitzar una mitjana dels quatre recomptes i es va multiplicar els resultats pel factor de dilució (1/ x total ml en el tub suspensió inicial); i si el nombre de conidis era massa gran s'havia d'incrementar la dilució i recomptar de nou .

En aquest segon assaig es van realitzar 240 observacions directes a la lupa binocular, determinant una estimació del nombre de conidis produïts(Sn) per cada unitat d'àrea dels discos. L'estimació del nombre de conidis produïts (Sc) es calcula com :

$S_n = (S_c \cdot V) / A$.

Sc: Concentració de conidis (conidis / mL)

V : Volum utilitzat segons el mètode d'extracció.

A : Àrea dels discos de fulla Conference (cm²).

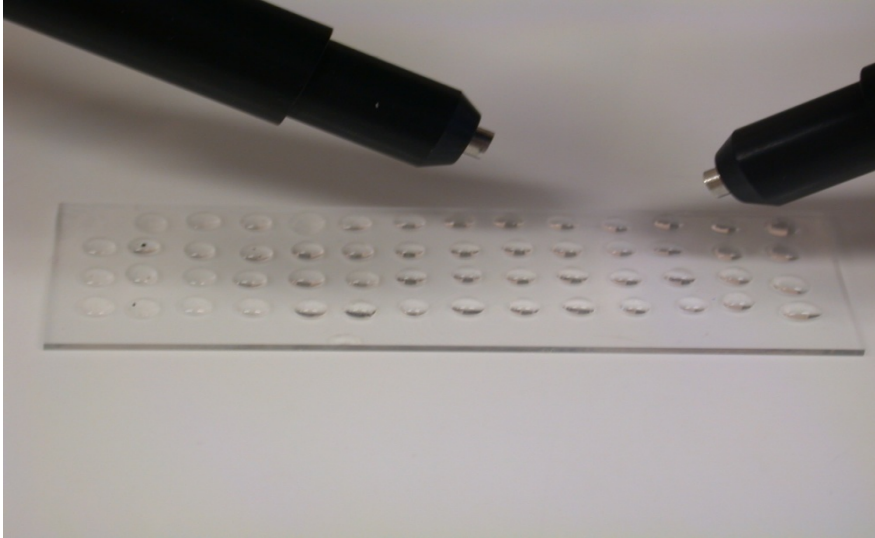


Fig.7. Observació al microscopi de les gotes de 5µl de les extraccions de conidis de *S.vesicarium*.

A partir del recompte, es van avaluar els diferents mètodes emprats i es va determinar el mètode més eficaç en l'extracció de conidis, i a més es va avaluar un mètode per saber els conidis que passat un temps s'havien alliberat. Es va determinar la concentració de producció de conidis i sobretot es va saber el mètode correcte per la extracció de conidis, optimitzant el temps de l'assaig.

3.EFECTE DE LA TEMPERATURA, LA HR I LA HUMECTACIÓ D'S.vesicarium

Malgrat la importància dels danys que ocasiona *S. vesicarium*, hi ha poca informació disponible sobre aspectes de la seva fisiologia referents a amplituds tèrmiques i a règims de llum favorables per l'esperulació sobre substrat natural. En aquest estudi es van realitzar dos assajos per determinar les condicions òptimes d'esperulació del fong sota condicions ambientals controlades.

En el primer assaig es va determinar l'efecte de la temperatura (5,10,15,20 i 27°C) i de la humitat relativa (60,80,88,96,98 i 100%) en la producció de conidis, i en el segon assaig es va determinar per una banda l'efecte de la temperatura (5,10,15,22,5 i 27°C) i la humitat relativa

(60,80,88,96,98 i 100%) (segon assaig A), i per altre banda l'efecte de la temperatura (5,10,15,22'5 i 27°C) sota condicions d'humectació (segon assaig B).

La soca de *S.vesicarium*, seleccionada per la seva elevada virulència, es va fer créixer en plaques Petri amb medi V8 modificat i sobre material "ex vivo " (fulles tretes de la planta i dipositades en plaques Petri amb paper de filtre humitejat) de fulles de perera de la varietat Conference.

3.1.INOCULACIÓ DEL PATÒGEN

La metodologia va ser diferent entre ambdós assajos.

En el primer assaig una vegada obtingut l' inòcul , 32 plantes de perera de la varietat conference, es van inocular polvoritzant tota la superfície de la planta amb la solució obtinguda.

Un cop assecades es van introduir a una cambra d'expressió. A la cambra hi van romandre durant 72 hores , a una temperatura de 21°C i a una HR ≥90%, gairebé a saturació. A dins la cambra, es van col·locar les plantes inoculades dins de unes bosses de plàstic (**Fig.8A**), les quals es van emplenar d'aigua vigilant de no rentar les fulles ja inoculades per aconseguir humectació, amb la qual s'indueixen les infeccions. Després es van lligar les bosses Passats 3 dies des de la inoculació, es van treure les plantes de la cambra i es van treure les bosses de plàstic, observant símptomes de la malaltia en les fulles (**Fig.8B**). D' aquest material vegetal se'n van fer discs, mitjançant uns trepans, de 1'3 cm² de superfície.

Aquests discs es van desinfectar, amb l'ajuda d'unes pinces, amb una solució d'aigua i lleixiu (Hipoclorit sòdic) a l'1% i rentats en aigua destil·lada dos vegades durant un minut respectivament; tot aquest procés va ser realitzar dins la campana de flux laminar (**Fig.9**).



Fig.8A. Plantes de perera inoculades i mantingudes dins de bosses de plàstic per tal d'induir infeccions. **8B.** Fulles de perera Conference amb infeccions d'*S.vesicarium*.

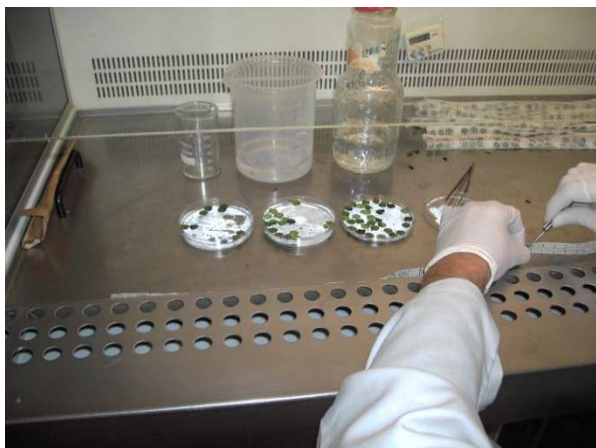


Fig.9. Procés de preparació dels discs, desinfecció i col·locació en els dispositius especials (Tires de malla de polietilè).

Mentre que en el segon assaig, mitjançant uns trepans es van fer els discs de fulla d' $1'3 \text{ cm}^2$ de plantes de perera completament sanes, aquests discs es van desinfectar igual que el procés abans descrit i es van col·locar en safates humides (sobre paper de filtre estèril humitejat amb aigua desionitzada estèril) on es van inocular. Mitjançant una pipeta autoclavable de volum fix es van inocular $20 \mu\text{l}$ en el revers de les fulles amb una solució d' *S.vesicarium* ajustada mitjançant un hemacitòmetre a $1'6 \cdot 10^5$ conidis/mL a cada disc i es van posar a incubar (incubadors Sanyo model 350, Gunman, Japan) durant tres dies a una temperatura de $22'5^\circ \text{C}$ i amb un fotoperíode de 12 hores de llum. Passats aquests tres dies ja es van observar els discs de fulla totalment infectats i amb lesions (taques necròtiques) visibles.

3.2.PREPARACIÓ DE SALS PER OBTENIR LES HUMITATS RELATIVES

Per determinar la influència de la temperatura i humitat relativa en el desenvolupament del fong, és necessària una temperatura i humitat relativa constant durant tot el període que va durar l'assaig.

Per poder crear un ambient controlat amb valors constants del 60, 80, 88, 96, 98 % d'humitat relativa va ser necessària una dissolució sobresaturada de sal a l'interior de la placa de petri on es trobava el fong. Per la humitat relativa de 100% es va utilitzar aigua estèril.

Els valors de temperatures assajats van ser de 5, 10, 15, 20 i 27°C i les humitats relatives del 60, 80, 88, 96, 98 i 100%. Les sals necessàries per a crear les diferents humitats relatives van ser escollides a partir d'una metodologia prèviament escrita (Dhingra,1987), la humitat relativa que produeixen depèn dels valors de temperatura com es pot observar en la **taula 3**.

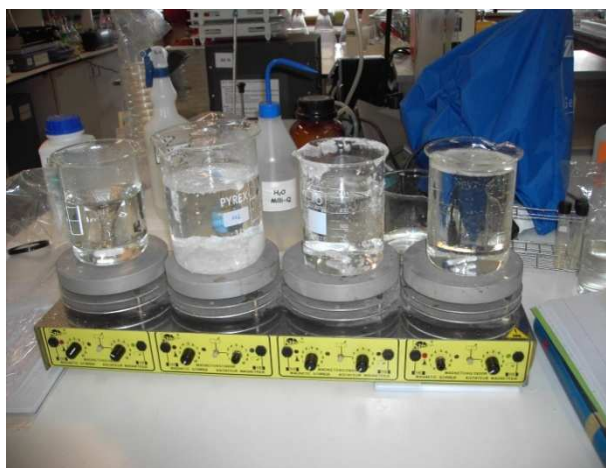


Fig.10.- Preparació de les solucions sobresaturades de sals sobre un agitador magnètic.

Taula 3.- Valors de temperatura i humitats relatives necessàries per dur a terme els diferents assaigs sota solucions sobresaturades de sals (Dhingra,1987).

Temperatura (°C)	HR (%)	Sals
5, 10, 15, 20, 27	60	Mg (NO₃)₂ x 6 (H₂O)
5, 10, 15, 20, 27	80	(NH₄)₂ SO₄
5, 10, 15, 20, 27	88	KCl
5, 10, 15	96	KNO₃
20, 27	96	KH₂PO₄
5, 10, 15, 20, 27	98	K₂SO₄

Un cop escollides les sals (**Taula 4**) es van calcular les quantitats necessàries per arribar al punt màxim de saturació de les dissolucions, quantitats calculades a partir dels valors de referència que corresponen als diferents valors de solubilitat de les diferents sals. Es van preparar solucions sobresaturades, dissolent les sals fins arribar al punt màxim de saturació en aigua bullint (100 °C), aquest augment de la temperatura produeix per tant un augment de la solubilitat del solut facilitant la seva dissolució. Donat que l'objectiu principal va ser crear dissolucions sobresaturades es va afegir un excés de sal.

Un cop obtingudes les solucions sobresaturades amb l'ajuda del agitador magnètic (**Fig.10**), es van deixar reposar durant dos o tres dies en sobresaturació. Mantenint el sistema de temperatura constant (Dhingra,1987). Essent el resultat del repòs de les dissolucions la formació de cristalls.

Taula 4.- Sals emprades per mantenir les diferents HR sota diferents temperatures.

Temperatura (°C)	HR (%)	Sals
5, 10, 15, 20, 27	60	Mg (NO ₃) ₂ x 6 (H ₂ O)
5, 10, 15, 20, 27	80	(NH ₄) ₂ SO ₄
5, 10, 15, 20, 27	88	KCl
5, 10, 15	96	KH ₂ PO ₄
20, 27	98	K ₂ SO ₄
5, 10, 15, 20, 27	100	H ₂ O estèril

3.3.INDUCCIÓ DE L' ESPORULACIÓ

Es van seguir dos metodologies diferents per determinar les condicions òptimes d' esporulació.

El primer assaig es va dur a terme mitjançant tubs de propilè i utilitzant el mètode de l'agitació.

Mentre que en el segon assaig es van emprar tubs i plaques Petri, tots dos procediments es van realitzar pel mètode de la homogeneïtzació combinat amb el mètode de la rotació.

El primer assaig es va realitzar durant un període de quatre setmanes (analitzant els resultats un cop per setmana) i se'n van fer dos repeticions. Amb l'ajuda d'unes pinces es van col·locar els discs de fulla amb lesions d' *S.vesicarium* en els dispositius especials (tires de malla de polietilè doblades i grapades formant caselles per poder-hi dipositar els discs), en grups de tres (**Fig.11A**). Cada grup de malla amb els seus tres discs es va introduir en un tub de propilè de 20 mL. amb la seva sal sobresaturada corresponent (es va posar 5 ml. de sal fase líquida de la solució sobresaturada més els cristalls per assegurar la HR)(**Fig.11B**).

Es van assajar 5 temperatures diferents (5, 10, 15, 20 i 27°C) i 6 humitats relatives (60, 80, 88, 96, 98 i 100%). En la primera repetició es van emprar les 6 HR mentre que en la segona repetició se'n van assajar només 4 (60, 88, 96 i 100%). Per cada combinació de temperatura, humitat i repetició es van utilitzar quatre tubs amb tres discs de fulla (1 tub per setmana). Es van emprar 30 discs per cada temperatura, observant per tant 150 discs cada dia. Es van fer 4 lectures de cada tub, realitzant 600 observacions cada setmana i 2400 observacions a les quatre setmanes.

Es van utilitzar 5 incubadors Sanyo, amb un fotoperíode homogeni de 12 hores de llum i 12 hores de foscor Els incubadors estaven equipats amb una bateria de tubs fluorescents de llum blanca que generaven una radiació de 150µmol·m⁻²·s⁻¹ mesurada a l'interior de la placa Petri amb dataloggers Hobo (model Hobo-Pendant; Spectrum Technologies Inc., Plainfield,IL). Cada setmana es van extreure i col·locar els tubs als incubadors.

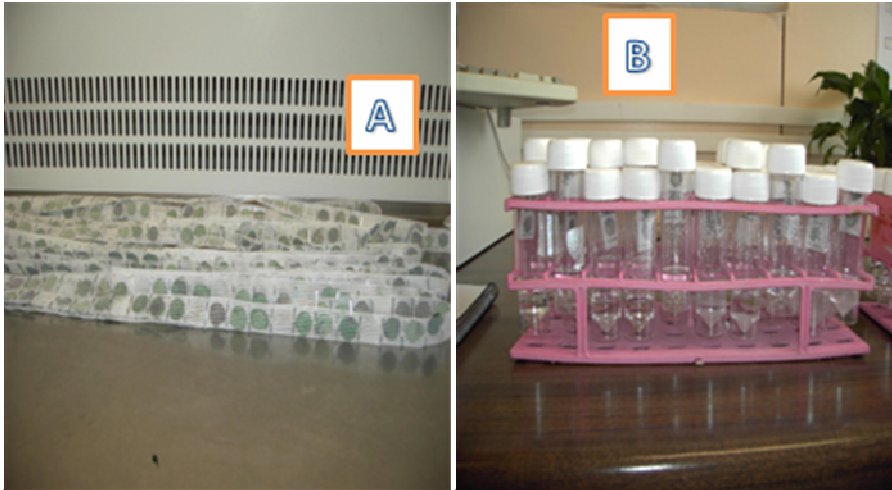


Fig.11A. Dispositius especials fets de malles de polietilè on es van inserir els discs de fulla. Es van col·locar els discs de tres amb tres deixant un espai buit entre ells per poder tallar-los i inserir-los dins del tub enganxats mitjançant el tap. **11B.**Tubs de propilè amb els dispositius especials ja enganxats.

El segon assaig va durar quatre setmanes, i a diferència del primer assaig els resultats es van observar únicament al cap de 28 dies de la inoculació. En aquest assaig després dels tres dies d'incubació després de la inoculació, els discs de fulla amb lesions, es van col·locar per una banda en els dispositius especials dins dels tubs, mentre que per l'altre es van col·locar en plaques petri amb condicions d'humectació (amb paper de filtre humit amb aigua estèril) i amb l'anvers de la fulla mirant cap amunt (**Fig.12**). Els tubs amb els dispositius especials (tres discs de fulla a cada tub) es van posar dins de 5 gradetes, una per cada temperatura i amb 36 tubs cadascuna, les quals juntament amb les 5 plaques de petri es van introduir en incubadors a diferents temperatures.



Fig.12. Discs de fulla de perera infectats amb *S.vesicarium*.

Es van utilitzar 5 temperatures diferents (5,10,15,22,5 i 27°C), 6 humitats relatives diferents (60,80,88,96,98 i 100%) (es van usar tres tubs per humitat i dos repeticions) i 5 plaques (amb tres discs a cada placa) a humectació observant per tant 180 tubs i 570 discs de fulles Conference.

3.4. EXTRACCIÓ DE CONIDIS

En el primer assaig es van preparar 150 tubs amb 3 discs de fulla a cada tub, utilitzant 30 tubs per cada temperatura. A cada tub se li van extreure els discs i es van introduir en diferents tubs, un disc per tub i se li va afegir 1,5ml d'aigua estèril i 10 µl de tween (0,6% de la solució). Aquests 30 tubs es van barrejar a l'agitador orbital a 180 r.p.m durant 5 minuts (Fig.13) i a continuació amb una pipeta es va extreure 5 µl (x 4 gotes), les quals es van col·locar directament al portaobjectes, per a procedir al recompte directe de conidis al microscopi. Alhora i paral·lelament es va mirar en tots els discs si s'havia format el micel·li (observació visual). Aquest procediment per cada dia de lectura, amb un total de 4 lectures.



Fig.13. Tubs de propilè amb els discs de fulla apunt per ser col·locats a l'agitador orbital digital.

En el segon assaig es van preparar 180 tubs amb 3 discs a cada tub i 5 plaques a humectació, aquests es van extreure i es van introduir en tubs individuals, i es van omplir amb 5 ml d'aigua desionitzada estèril. Es va agafar cada tub i es va homogeneïtzar durant 2 minuts a una velocitat de 7000 r.p.m, passant posteriorment pel vòrtex durant 30 segons. Cada cop que es va utilitzar el politró es va netejar (desenganxant els trossos de disc que no es van triturar i evitant la disminució de la velocitat de l'aparell i la veracitat del mètode). De cada tub amb una pipeta es van extreure 5µl (4 gotes), de les quals se'n va observar els conidis produïts. Es van realitzar 2280 recomptes directes amb lupa binocular (1200x), amb els quals es va obtenir una estimació del nombre de conidis produïts (S_n) per cada unitat d'àrea dels diferents discos. L'estimació del nombre de conidis produïts (S_c) es calcula com:

$$S_n = (S_c \cdot V)/A$$

S_c : concentració de conidis (conidis x ml).

V : volum utilitzat durant el politronat.

A : àrea dels discos de fulla de perera (cm²).

3.5. ANÀLISI ESTADÍSTIC DE LES DADES

La variable analitzada va ser el número de conidis/ cm² de fulla.

Per determinar l'efecte de la temperatura i humitat relativa en l' esporulació, es va realitzar un anàlisi de la variància (ANOVA). Es va fer l'anàlisi de la variància mitjançant el procediment GLM. En els dos assajos (primer assaig i segon assaig) que es va determinar l'efecte de la temperatura i la humitat relativa en la producció de conidis, l'anàlisi es va fer a partir d'un disseny de tres factors (temperatura, humitat relativa i repetició de l'assaig amb les seves respectives interaccions). L'assaig (segon assaig) en el qual es va determinar l'efecte de la temperatura sota condicions d'humectació el disseny va ser de dos factors (temperatura i repetició, amb les seves interaccions). La normalitat dels residus es va analitzar amb la prova de Shapiro-Wilk i l'homogeneïtat de les variàncies es va analitzar amb la prova de Bartlett. Per fer l'anàlisi de separació de mitjanes es va utilitzar la prova de Fisher protegida amb una probabilitat ($P < 0.05$).

Es va utilitzar el paquet estadístic SAS, Versió 8.02 (SAS Institute Inc., Cary, NC.USA). Per homogeneïtzar les variàncies es van transformar les variables en el seu $\log_{10}(\text{conidis/cm}^2 + 1)$.

RESULTATS

1. AVALUACIÓ DE DIFERENTS MÈTODES D'EXTRACCIÓ DE CONIDIS D' *S.vesicarium*.

Assaig A. Extracció de conidis a partir de colònies d' *S.vesicarium* crescudes en medi V8.

En l'assaig A es va observar que el mètode de la microagitació i sobretot l'agitació permetien alliberar més conidis que el mètode de la rotació, però els tres van donar una concentració de conidis/cm² baixa.

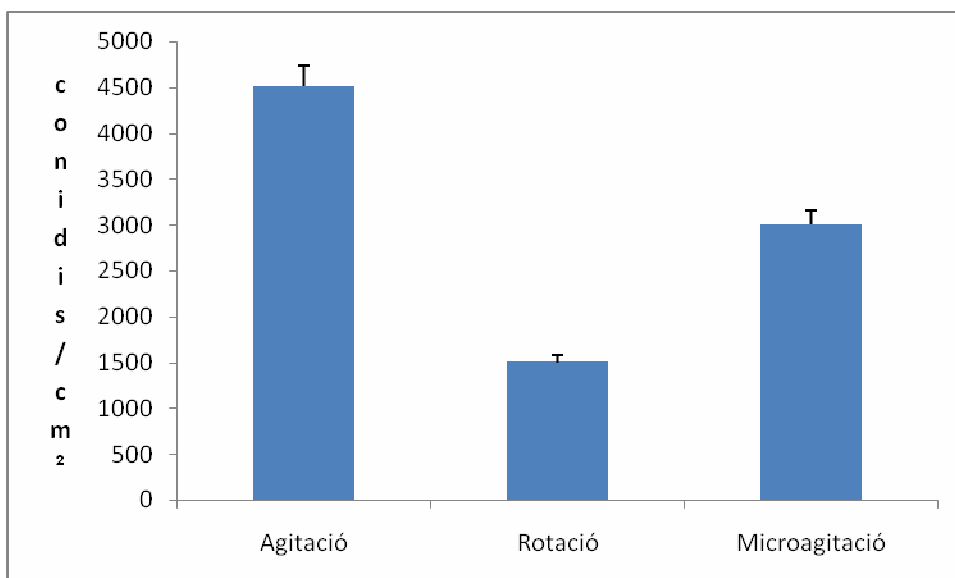


Fig.14.Eficàcia dels tres mètodes emprats en l'extracció d'espores produïdes en diferents colònies sembrades en plaques Petri, a partir de discs d'agar d'1'33cm².

Assaig B. Extracció de conidis a partir de colònies crescudes en fulles de perera.

En l'assaig B es va observar que el mètode de la homogeneïtzació diferia significativament ($P < 0,05$) de la resta dels mètodes. Aquest mètode va permetre extreure una quantitat superior d'espores per mostra processada ($8 \cdot 10^3$ conidis/cm²), ja que al triturar el material vegetal es va aconseguir alliberar tots els conidis. Es va observar que en el mètode de la microagitació s'alliberaven bastant bé els conidis però s'assolia una temperatura massa elevada.

A més el material vegetal emprat, fulles de perera Conference, va permetre extreure els conidis més fàcilment que en els discs d'agar.

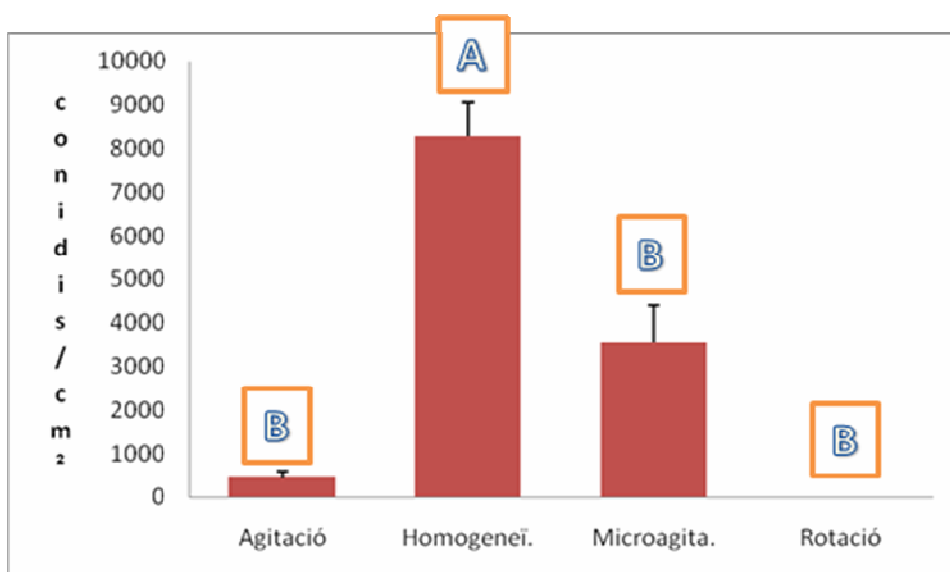


Fig.15.Eficàcia dels quatre mètodes assajats en l'extracció d'espores produïdes a partir de colònies crescudes en fulles de perera de la varietat Conference, a partir de discs de fulla d'1'33cm².

2. EFECTE DE LA TEMPERATURA, LA HUMITAT RELATIVA I LA HUMECTACIÓ D' *S. vesicarium*

2.1. Primer assaig

En el primer assaig és va determinar l'efecte de la temperatura (5,10,15,20 i 27°C) i de la humitat relativa (60,80,88,96,98 i 100%) en la producció de conidis, en un període de 28 dies, on els resultats es van assajar cada setmana i amb el mètode d'extracció de l'agitació. Es pot observar el resultat obtingut per les diferents dates de lectura (7,14,20 i 28 dies a partir de la inoculació) a partir de dos repeticions. En la segona repetició es va assajar amb 4 humitats relatives (60, 88,96 i 100) (**fig.16,17,18 i 19**).

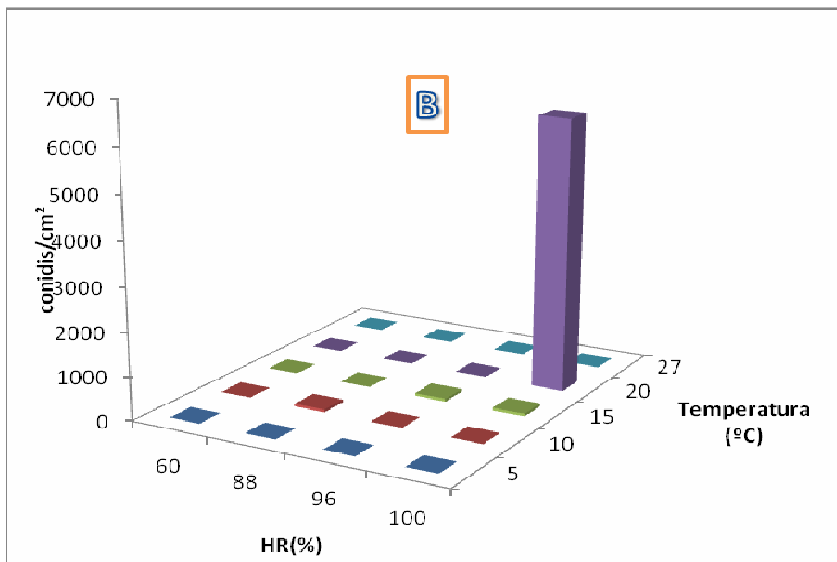
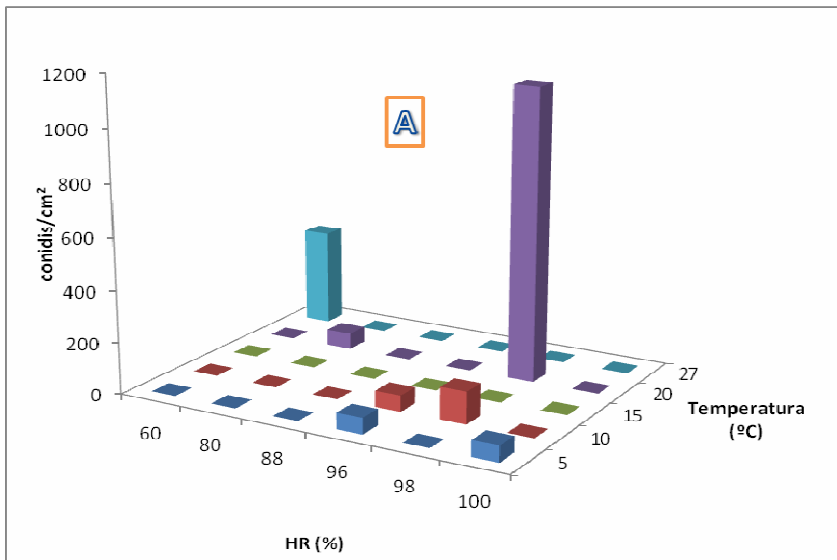


Fig. 16. Producció de conidis d'*S. vesicarium* en funció de la temperatura i humitat relativa sota condicions controlades i amb material "ex vivo" de perera, al cap de 7 dies de ser inoculats.

Primera repetició .**A**

Segona repetició .**B**

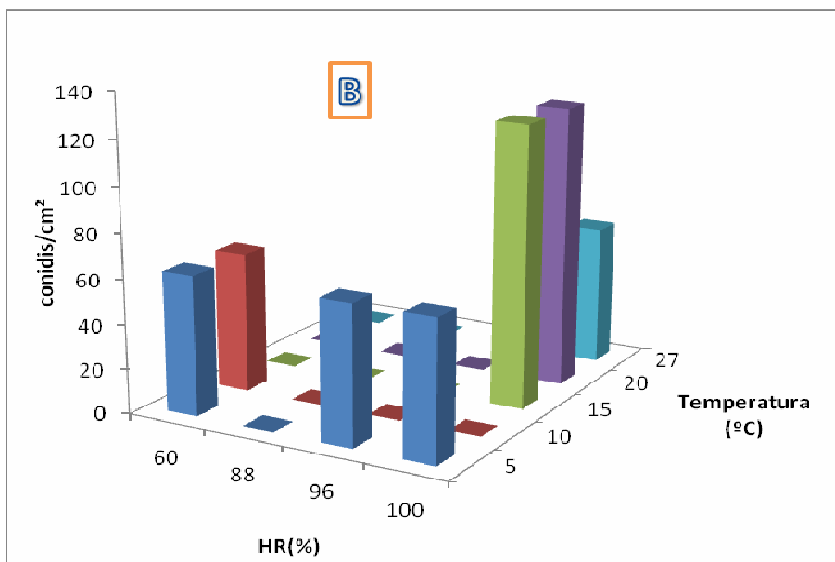
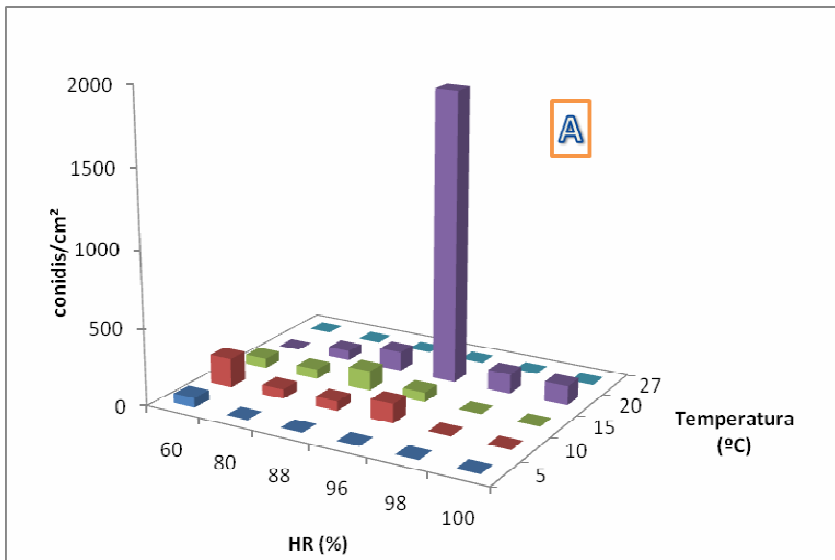


Fig.17.Producció de conidis d'*S.vesicarium* en funció de la temperatura i humitat relativa sota condicions controlades i amb material "ex vivo" de perera, al cap de 14 dies de ser inoculats.

Primera repetició .**A**

Segona repetició .**B**

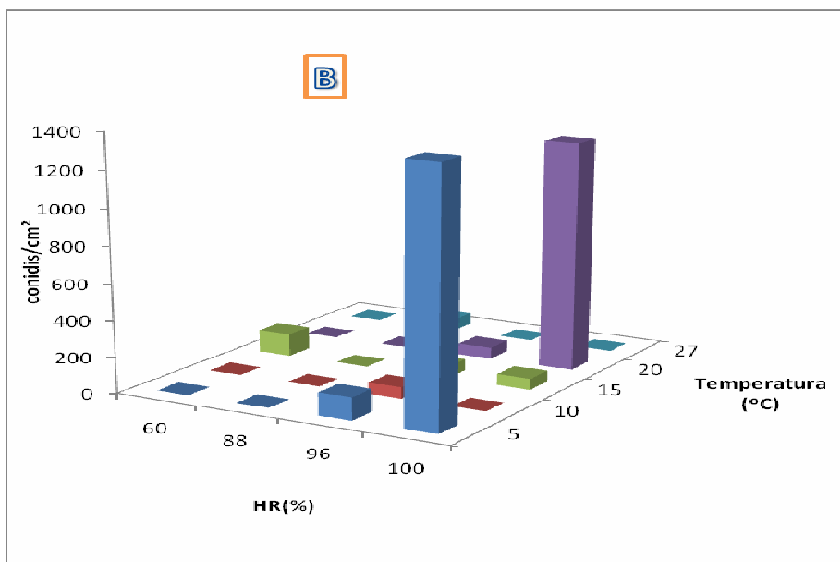
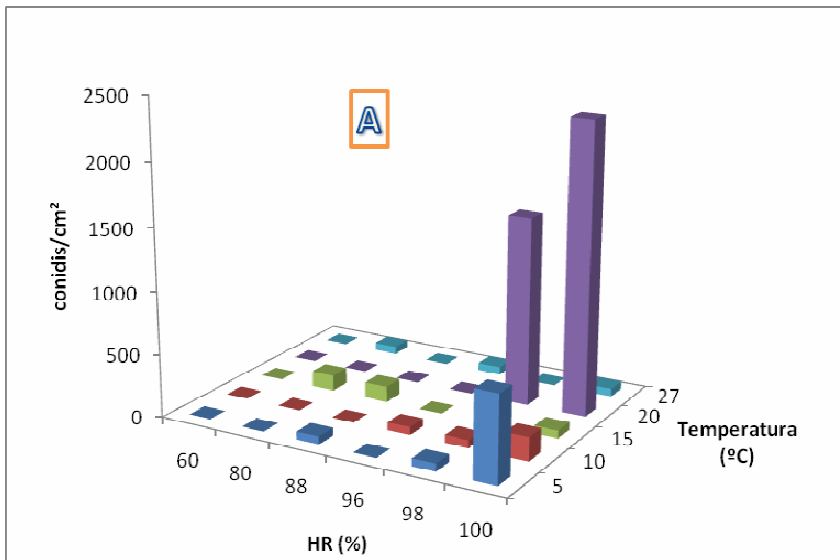


Fig.18.Producció de conidis d'*S.vesicarium* en funció de la temperatura i humitat relativa sota condicions controlades i amb material "ex vivo" de perera, al cap de 20 dies de ser inoculats.

Primera repetició .A

Segona repetició .B

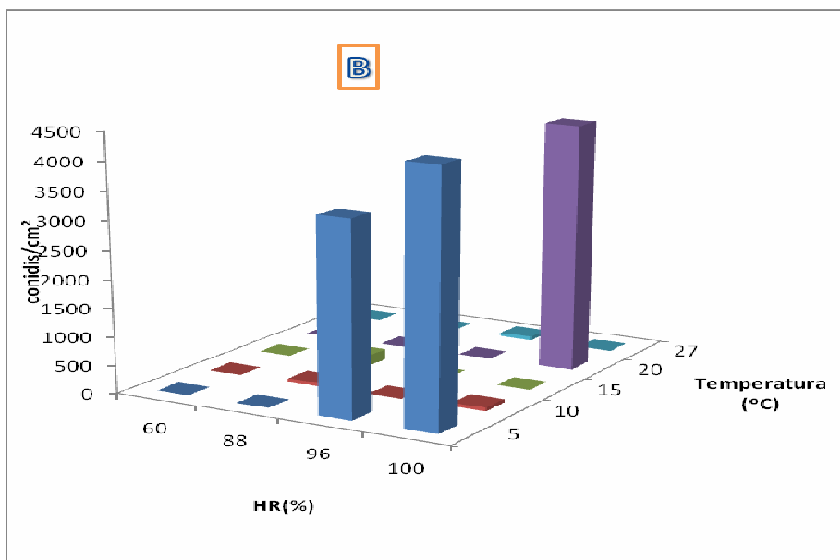
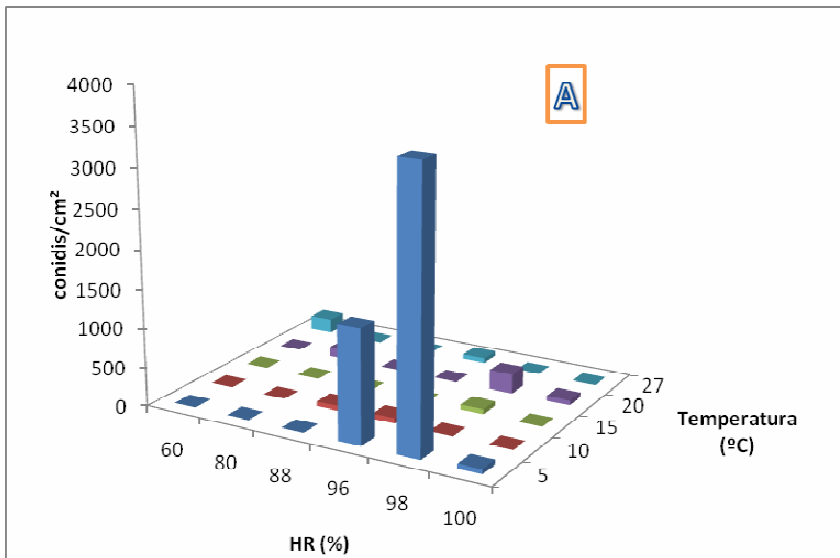


Fig.19.Producció de conidis d'*S.vesicarium* en funció de la temperatura i humitat relativa sota condicions controlades i amb material "ex vivo" de perera, al cap de 28 dies de ser inoculats.

Primera repetició .A

Segona repetició .B

El nivell d'espores capturat va ser molt baix en tot el primer assaig per la major part de lectures. Es va observar una gran variabilitat al llarg de l'assaig.

Es va determinar que l'efecte de la repetició era significatiu ($P < 0,05$), i no es van poder analitzar les dades conjuntament.

Es va determinar l'efecte de la temperatura, humitat relativa i també la data en la producció de conidis (**Taula 5.1. i 5.2.**), i es va determinar que l'efecte de la temperatura, humitat relativa i data no eren significatius, però les seves interaccions sí que ho eren. Donat que l'efecte de la

data és no significatiu es presenten les **fig. 20.A** i **20.B**.obtingudes a partir de les mitjanes per totes les dates. Tant per la primera repetició com per la segona.

Taula 5.1. Efecte de la temperatura, humitat relativa, dates i les seves interaccions en la producció de conidis/cm². Les dades corresponen a la combinació de les quatre setmanes que va durar la primera repetició del primer assaig, les quals es van transformar a log₁₀ ja que les variàncies no eren homogènies.

	g.II.^a	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	Valors de F	Probabilitat>F
T	4	3.84	0.96	1.23	0.3002
HR	5	4.23	0.85	1.08	0.3718
Data	3	3.36	1.12	1.43	0.2341
T*HR	20	34.61	1.73	2.21	0.0027
T*HR*Data	87	100.55	1.16	1.48	0.0110

^a:Graus de llibertat

Taula 5.2. Efecte de la temperatura, humitat relativa, dates i les seves interaccions en la producció de conidis/cm². Les dades corresponen a la combinació de les quatre setmanes que va durar la segona repetició del primer assaig i es van transformar a log₁₀ ja que les variàncies no eren homogènies.

	g.II.^a	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	Valors de F	Probabilitat>F
T	4	7.09	1.77	2.34	0.0576
HR	3	15.37	5.12	6.76	0.0003
Data	3	3.67	1.22	1.62	0.1878
T*HR	12	24.48	2.04	2.69	0.0025
T*HR*Data	57	55.04	0.97	1.27	0.1223

^a:Graus de llibertat

A la **Taula 5.2.** es va observar que en l'anàlisi combinat de les quatre setmanes, la temperatura, la data i la interacció entre les tres no eren significatives. Mentre que la interacció entre la temperatura i la HR i la humitat relativa si van diferir significativament. La humitat relativa del 100% difereix significativament de les altres tres humitats relatives, essent la concentració de conidis/cm² el doble de les altres (96, 88 i 60).

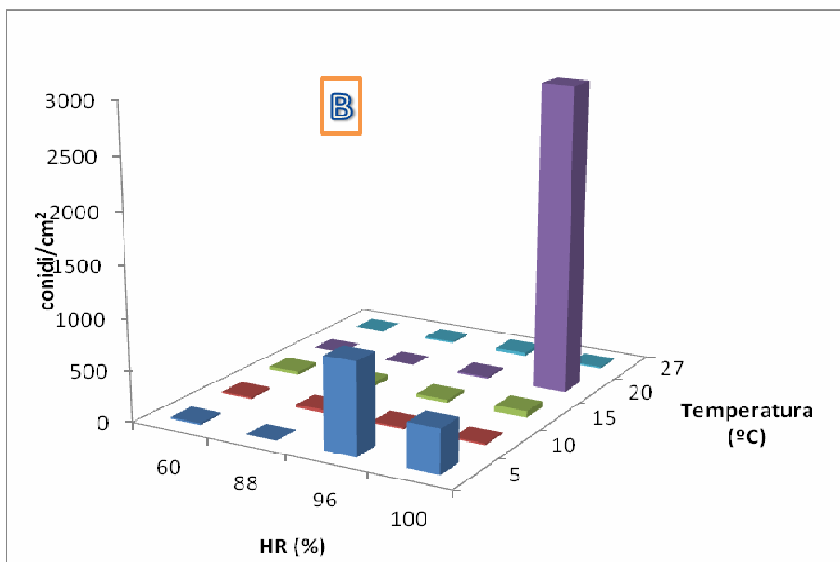
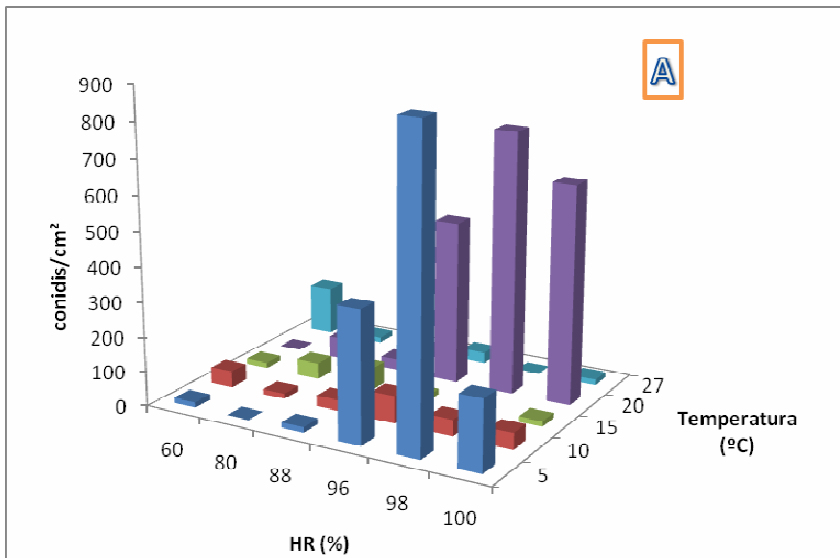


Fig.20.A i 20.B. Producció de conidis d'*S.vesicarium* en funció de la temperatura i humitat relativa. Els valors corresponen a la mitjana de les quatre lectures realitzades als (7,14,20 i 28 dies).

2.2.Segon assaig

En el segon assaig es va determinar per una banda l'efecte de la temperatura (5,10,15,22'5 i 27°C) i la humitat relativa (60,80,88,96,98 i 100%) (segon assaig A), i per altre banda l'efecte de la temperatura (5,10,15,22'5 i 27°C) sota condicions d'humectació (segon assaig B).

Es va analitzar separatament els resultats obtinguts per determinar l'efecte de la temperatura i humitat relativa en l' esporulació i dels resultats obtinguts per determinar les condicions de la temperatura sota condicions d'humectació. En ambdós procediments es va fer dos repeticions.

En aquest assaig els resultats obtinguts amb la humitat relativa del 60 % es va desestimar ja que durant el processament de les mostres es va deixar aquesta humitat per assajar al final, i degut a la durada del procés les dades van sortir errònies.

2.2.1. Segon assaig A

Es va determinar l'efecte de la temperatura, humitat relativa i repetició del segon assaig A amb les seves interaccions en la producció de conidis. Es va determinar que l'efecte de la temperatura i humitat relativa eren significatius ($P < 0,05$) però no l'efecte de la repetició, per aquest motiu es van analitzar les dades de les dos repeticions de manera conjunta (**Taula 6**).

Es presenten els valors de conidis/cm² obtinguts en les dues repeticions del segon assaig A.

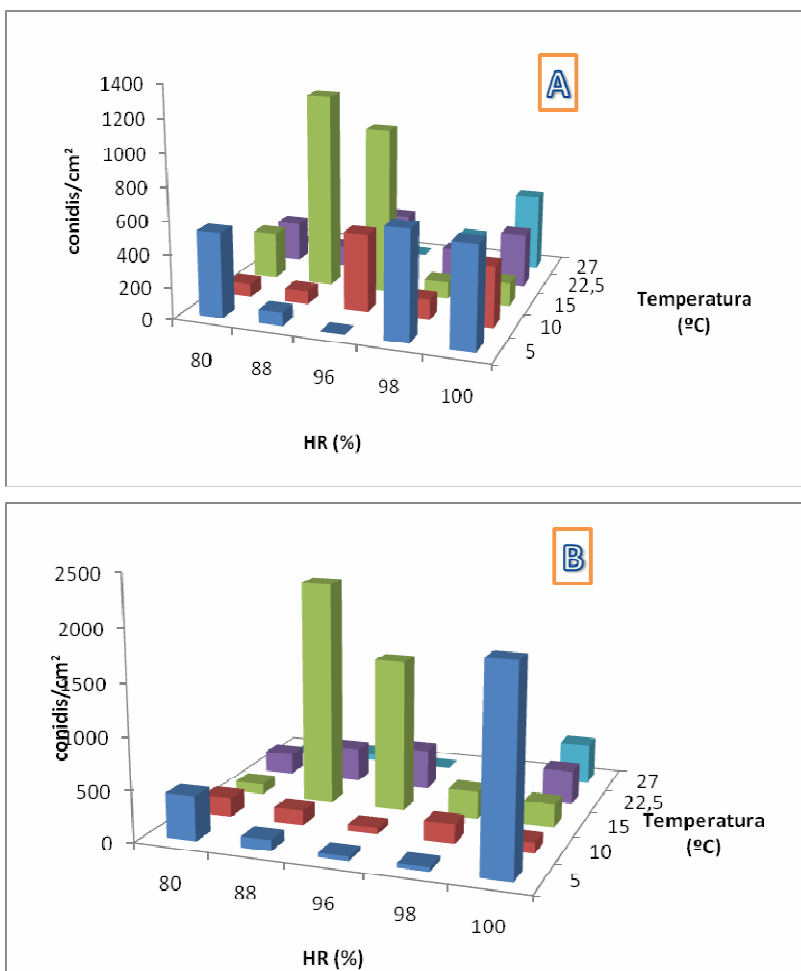


Fig.21. Producció de conidis d'*Stemphylium vesicarium* en funció de la temperatura i humitat relativa. Els valors corresponen a la producció mitjana en 3 discos de fulla de la varietat Conference els 28 dies d'haver inoculat el patogen.

Primera repetició. **A**

Segona repetició. **B**

En ambdós repeticions es van obtenir produccions semblants de conidis d'*S.vesicarium* per a cadascuna de les combinacions assajades. (**Fig.21.A i 21.B**).

A la **taula 6** es va observar que en l'anàlisi combinat d'ambdós repeticions, la temperatura, la humitat relativa i la seva interacció diferien significativament. Mentre que l'efecte de la repetició del assaig no era significatiu, i per tant es van analitzar les dades conjuntament.

Es van observar diferències significatives entre les diferents temperatures ($P < 0,0001$) i humitats relatives ($P = 0,0006$) assajades, com també la seva interacció ($< 0,0001$) sobre l'esperulació.

Taula 6. Efecte de la temperatura, humitat relativa i repetició amb les seves interaccions en la producció de conidis/cm². Les dades corresponen a la combinació de les dues repeticions (A i B) del segon assaig A i han estat transformades a \log_{10} ja que les variàncies no són homogènies.

	g.l. ^a	Suma de quadrants	Mitjana de quadrats	Valors de F	Probabilitat > F
T	4	22.26	5.57	9.85	<0.0001
HR	4	12.08	3.02	5.35	0.0006
Repetició	1	0.50	0.50	0.89	0.3472
T*HR	16	61.63	3.85	6.82	<0.0001
T*HR*Repetició	24	19.50	0.81	1.44	0.1091

^a:Graus de llibertat

Es va observar a la **Taula 7** que la temperatura de 15°C diferia de la resta de temperatures, essent l'òptim d'esperulació. A més la temperatura de 27°C també diferia de les altres, amb la menor producció de conidis/cm². Les temperatures de (22'5,10 i 5°C) no van diferir entre elles.

A la **fig.22**. es pot veure que l'esperulació està relacionada amb la temperatura mitjançant l'equació $y = \log_{10} (\text{conidis/cm}^2 + 1) = -0.007x^2 + 0.209x + 0.776$ on $R^2 = 0.901$ essent l'òptim a 14'94°C.

Taula 7. Efecte de la temperatura en la producció de conidis/cm². Les dades corresponen a la combinació de les dues repeticions del segon assaig A i han estat transformades en \log_{10} . Les mitjanes amb la mateixa lletra no difereixen significativament segons la prova de Fisher protegida ($P < 0.05$).

Temperatura(°c)	Conidis/cm ² (log ₁₀)	
15	2.44	A
22.5	1.99	B
10	1.95	B
5	1.74	B
27	1.26	C

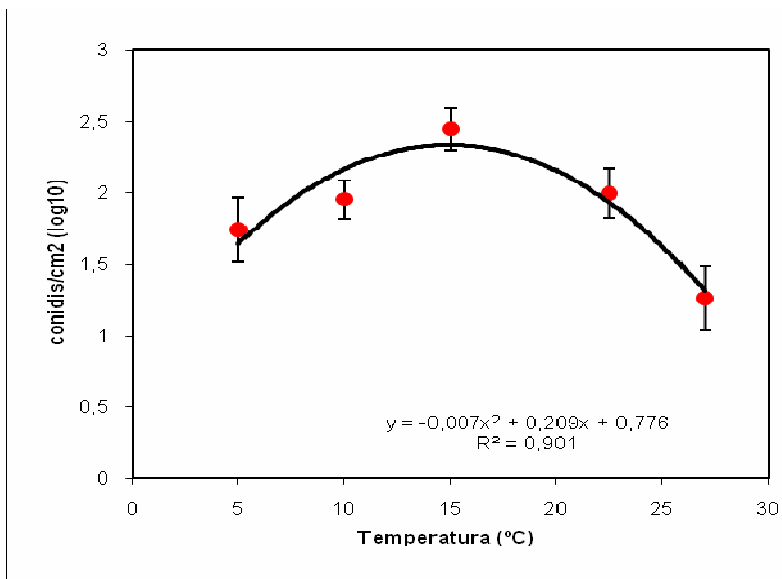


Fig.22. Efecte de la temperatura en l'esperulació de *S.vesicarium* per un rang d'humitats relatives entre 80 i 100%. Es presenta l'ajust polinomial.

Es va veure en la **Taula 8** que la humitat relativa de 100 i 88% no difereixen entre elles però sí amb la resta, essent aquestes dues les humitats amb més concentració de conidis/cm². En la humitat relativa del 100% es podria haver format condensació al posar-los a l'incubador a temperatures baixes (5°C) provocant una possible humectació; per tant es va considerar la humitat relativa del 88% com la òptima d'esperulació.

Taula 8. Efecte de la humitat relativa en la producció de conidis/cm². Les dades corresponen a la combinació de les dues repeticions del segon assaig A i han estat transformades en log₁₀. Les mitjanes amb la mateixa lletra no difereixen significativament segons la prova de Fisher protegida (P<0.05).

Humitat relativa	Conidis/cm² (log ₁₀)	
100	2.32	A
88	2.07	AB
80	1.81	BC
98	1.63	C
96	1.56	C

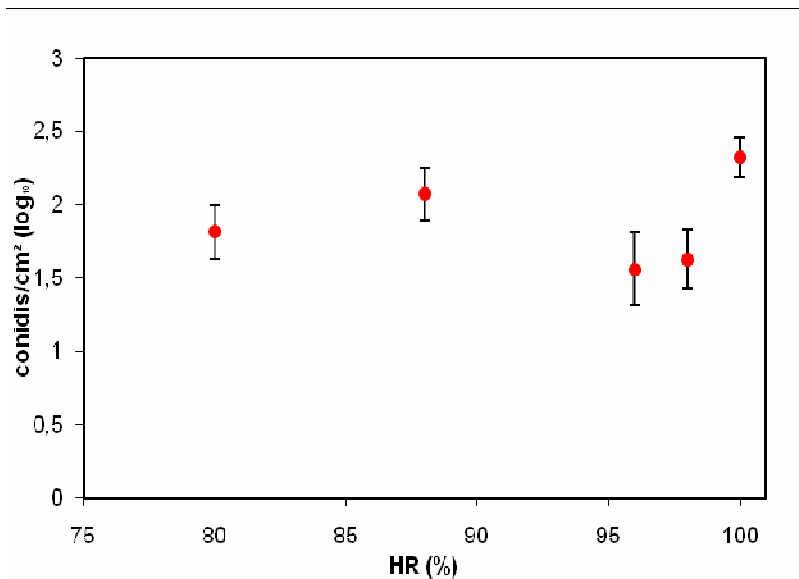


Fig.23. Efecte de la humitat relativa en l'esperulació de *S.vesicarium* per un rang de temperatures entre 5 i 27°C.

Donat que l'efecte de la repetició és no significatiu es presenta la **fig.24** obtinguda a partir de les mitjanes de les dos repeticions.

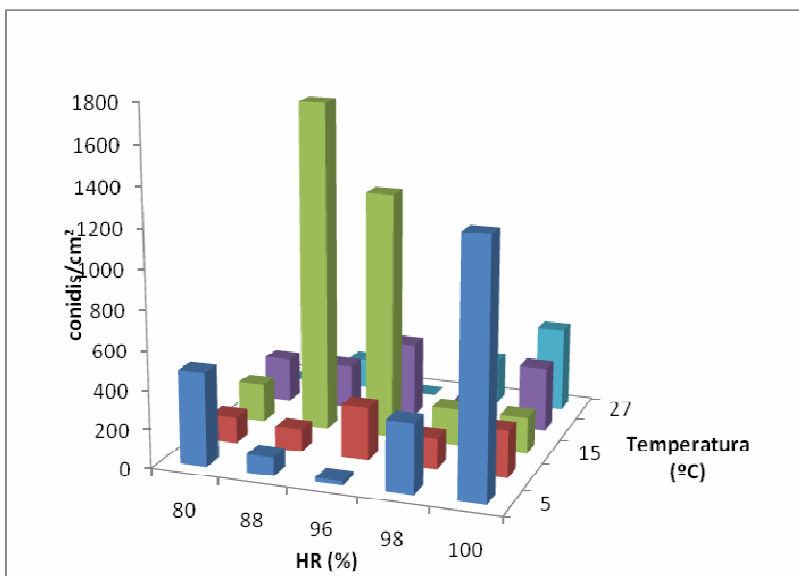


Fig. 24. Producció de conidis d'*Stemphylium vesicarium* en funció de la temperatura i humitat relativa. Les dades corresponen a les mitjanes de les dos repeticions (A i B) del segon assaig A.

2.2.2. Segon assaig B

Efecte de la temperatura en condicions d'humectació en l' esporulació (conidis/cm²) d'*S.vesicarium* en un període de 28 dies (on es van avaluar els resultats l'últim dia). Es van realitzar dos repeticions.

Es va observar que la temperatura diferia significativament, mentre que la repetició i la interacció, no, de tal manera que es van poder combinar els resultats de les dues repeticions (**Taula 9**).

Taula 9. Efecte de la temperatura i repetició amb condicions d'humectació en l' esporulació (conidis/cm²), segons l'anàlisi de la variància (ANOVA).

	g.l. ^a	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	Valors de F	Probabilitat>F
T	4	178057272.3	44514318.1	3.53	0.0270
Repetició	1	174478.9	174478.9	0.01	0.9077
Repetició*T	4	61181013.7	15295253.4	1.21	0.3399

^a:Graus de llibertat

Es va observar en la com la temperatura de 22'5°C diferia significativament de la resta de temperatures en humectació i que la concentració de conidi/cm² sota condicions d'humectació a aquesta temperatura era sis vegades major a l'efecte amb la humitat relativa (**Taula 10 i fig.25**).

Taula 10. Efecte de la temperatura amb humectació en la producció de conidis/cm². Les dades corresponen a la combinació de les dos repeticions. Les mitjanes amb la mateixa lletra no difereixen significativament segons la prova de Fisher protegida (P<0.05).

Temperatura(°c)	Conidis/cm ²	
22.5	29404	A
5	6252	B
15	3380	B
27	3276	B
10	3161	B

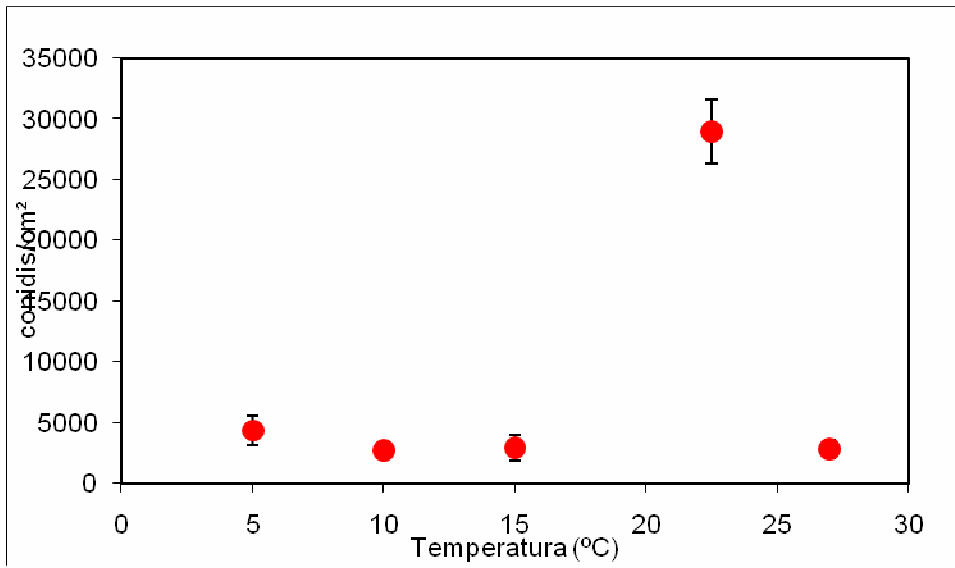


Fig.25. Producció de conidis en funció de la temperatura sota condicions d'humectació de les dades corresponents a la combinació de les dos repeticions (A i B) del segon assaig B.

DISCUSSIÓ

Es van realitzar dos metodologies per desenvolupar i posar apunt un mètode d'extracció, producció i recompte de conidis. A més es va determinar l'efecte de les condicions ambientals relacionades amb la biologia del patogen i per tant les condicions òptimes d' esporulació (conidis/cm²) i posterior formació d'inòcul, aconseguint desenvolupar un model dinàmic de predicció de la producció de conidis d'*S.vesicarium* complementari a l'existent model BSPcast que prediu el risc d'infecció, disminuint considerablement el número de tractaments.

A partir de les diferents metodologies assajades en l'assaig A i en l'assaig B es va observar, que cap dels mètodes aconseguia alliberar totalment els conidis del medi, però el mètode de la homogeneïtzació permetia obtenir una concentració major de conidis, segurament degut a què el polítró triturava completament la fulla i permetia alliberar més conidis del medi. El mètode de la microagitació, amb el qual es va obtenir un nivell alt d'espores per volum, durant el processat de les mostres provocava un increment de la temperatura de la preparació. Aquest increment es degut a que els ultrasons generen una microagitació que accelera el procés d'extracció tant en fluids normals com supercrítics. El mètode de l'agitació va resultar poc eficient encara que si molt pràctic. A més es va observar que s'alliberaven millor els conidis en discs de fulla que en discs d'agar, ja que el material vegetal era més fàcil de destruir.

En el primer assaig els resultats que es van obtenir no van ser els esperats degut segurament a què en aquest segon assaig no es va utilitzar el mètode òptim en la producció, extracció i quantificació de conidis d'*S.vesicarium*. Es va observar una presència de conidis molt baixa durant tot l'assaig i només es va veure afectada la quantitat de conidis en funció de la humitat relativa.

A partir de la segona setmana a temperatures elevades i a HR altes es va observar que els pocs conidis que havien esporulat ja hi havia formació del micel.li.

En el segon assaig A, es va observar que l' esporulació de conidis/cm², en condicions sense humectació, era funció de la temperatura i que la humitat relativa estava al límit de ser un factor determinant. En les diferents condicions d'humitat es va observar que la temperatura era el factor limitant en la producció de conidis, coincidint amb els resultats que es varen obtenir amb *Allium sativum* (Prados-Ligero et al, 2002).

A partir de les diferents temperatures assajades (5,10,15,22.5 i 27°C) i per les diferents condicions d'humitat (60, 80, 88, 96, 98 i 100%) es va determinar l'equació en log₁₀ (conidis/cm²) = -0.007x²+0.209x+0.776 on R²=0.901, essent la temperatura òptima d' esporulació en condicions ambientals controlades i sense humectació de 14'94°C, per un rang d'humitats relatives entre 88 i 100%.

En aquest assaig les dades corresponents a la HR del 60 % es van desestimar per un error en la lectura de les dades.

En el segon assaig B es va determinar que la humectació és el factor més determinant en la producció de conidis d'*S.vesicarium*. La humectació, juntament amb la HR van ser descrits com a factor determinants en el desenvolupament d'*S.vesicarium* (Bassallote-Ureba et al.,1999;Llorente et Montesinos, 2002). En condicions d'humectació i temperatures de 22'5°C, les concentracions de conidis produïts es va multiplicar per sis. Aquests resultats van coincidir amb la temperatura òptima d'infecció d'*S.vesicarium* i amb el rang òptim de temperatures perquè hi hagi esporulació en condicions de camp (15-25°C) (Rossi et al., 2005) i alhora coincideix amb el rang de temperatures (15-25°C) en el que es va obtenir una major taxa de creixement vegetatiu del fong (Montesinos et Vilardell, 1996).

Durant tot l'estudi (primer assaig i segon assaig A i B) es va observar que a temperatures inferiors (5°C) i humitats relatives >96% s'obtenia una producció de conidis considerable. Això podria ser degut, a que al introduir els tubs amb els seus corresponents discs al incubador, formés una mica de condensació i aleshores es produís humectació. Al produir humectació la concentració de conidis va augmentar considerablement i per tant aquestes dades van ser desestimades.

Per tant, en aquest estudi es va aconseguir aportar coneixements nous en el procés d'esporulació d' *S.vesicarium* complementant la resta d'estudis realitzats pel mateix fong.

CONCLUSIONS

Les conclusions que es deriven d' aquest treball han estat:

- Dels diferents mètodes assajats (rotació, agitació, microagitació i homogeneïtzació), el mètode més eficaç per l'extracció de conidis *d'S.vesicarium* és el mètode de la homogeneïtzació mitjançant el politró.
- Les condicions ambientals òptimes per l' esporulació (formació de conidis/cm²) sense humectació van ser temperatures de 15°C per humitats relatives entre 88-100%.
- La concentració de conidis *d'S.vesicarium* produïts en condicions d'humectació va resultar ser de sis vegades superior que sense humectació. La temperatura òptima en condicions d'humectació és de 22'5°C.

BIBLIOGRAFIA

- Arthur, S. and Thomas, M.B.** (2001 b). Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metharizium anisopliae* var. *acidum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. Journal of invertebrate pathology 78 (2) :59-65.
- Basallote-Ureba, M.J., Melero-Vara, J.M., Pérez de Algaba, A. and Prados-Ligero, A.M.** (1996). Manchas foliares ocasionadas por *Stemphylium vesicarium* en el cultivo del ajo. Phytoma Spain 76 : 36-39.
- Basallote-Ureba, M.J., Prados-Ligero, A.M. and Melero-Vara, J.M.** (1999). Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. Plant Pathology 48 : 139-145.
- Blancard, D., Allard, E. and Brest, P.** (1989). La stemphyliose du poirer ou “ macules brunes “. Phytoma 406 : 37-38.
- Brunelli, A., Ponti, I. and Cavanni, P.** (1983). Il punto sulla maculatura bruna del pero. L'informatore Agrario. Verona 2 : 26421-26425.
- Brunelli, A., Rovesti, L., Di Marco, S. and Ponti, I.** (1986). Attività di diversi fungicidi contro la maculatura bruna del pero. Rivista di Frutticoltura 1 : 51-54.
- Campbell, M.A., Medd, R.W. and Brown, J.F.** (1996). Growth and sporulation of *Pyrenophora semeniperda* in vitro : effects of cultura media, temperatura and pH. Mycological research 100 : 311-317.
- Canestrone, R., Malvolto, C. and Mazzini, F.** (1988). Lotta integrata in Emilia Romagna. Agricoltura. Supplemento 3 : 42- 43.
- Cavanni, P. and Ponti, I.** (1994). Maculatura bruna del pero : micopatia sempre d'attualità. Rivista di Frutticoltura 12 : 37-42 .
- Cugier, J.P. and Humbert, W.** (1991). Stemphyliose du poirer. Etude de la biologie du parasite et recherches des fongicides actifs. Phytoma 431 : 47–50.
- Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B.** (1987). Basic Plant Pathology Methods. CRC Press. Florida. APPENDIX A : 313-314 .
- De la Cruz, J.I., Martinez, M.A. and Rodriguez Bernabé, J.A.** (1997). Incidència de las plagas y enfermedades en las Comunidades Autónomas durante 1996. Phytoma Spain 87 : 28-35.
- Iglesias, I., Asín, L., Montserrat, R., Vilardell, P., Carbó, J. and Bonany, J.** (2003). Comportamiento de algunos patrones de peral en Lleida y Girona. ITEA 99 : 112-121.
- Khazada, M.A., Rajput, A.Q. and Shahzad, S.** (2006). Effect of médium, temperatura, light and inorganic fertilizers on in vitro growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* isolated from mango. Pakistan Journal of Botany 38 : 885-889.
- Lalancette, N., Foster, K.A. and Robinson, D.M.** (2003). Quantitative models for describing temperature and moisture effects on sporulation of *Phomopsis amygdali* on peach. Phytopathology 93 : 1165-1172.

- Llorente, I.** (1997). Desenvolupament d'un sistema de previsió de risc d'infecció per *Stemphylium vesicarium*. Avaluació, validació i implementació en parcel·les experimentals en camps comercials de perera. Tesi doctoral, Girona. Universitat de Girona, 1997.
- Llorente, I., Vilardell, P., Bugiani, R., Gherardi, I. and Montesinos, E.** (2000). Evaluation of BSPcast disease warning system in reduced fungicide use programs for management of brown spot of pear. *Plant disease* 84 : 631-637.
- 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.** (2006 a). Brown spot of pear : an emerging disease of economic importance in Europe. *Plant disease* 90 (11) : 1368-1375.
- MacHardy, W.E.** (1996). Apple scab. Biology, epidemiology and management. APS press, 1996.
- Monroe, J.S., Santini, J.B. and Latin, R.** (1997). A model defining the relationship between temperature and leaf wetness duration, and infection of watermelon by *Colletotrichum orbiculare*. *Plant disease* 81 : 739-742.
- Montesinos, E. and Vilardell, P.** (1992). Evaluation of fast as a forecasting system for scheduling fungicide sprays for control of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Plant disease* 76 : 1221-1226.
- Montesinos, E. Moragrega, C., Llorente, I. and Vilardell, P.** (1995a). Susceptibility of selected european pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age. *Plant disease* 79 : 471-473.
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P., Bonaterra, A., Ponti, I., Bugiani, R., Cavanni, P. and Brunelli, A.** (1995b). Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. *Phytopathology* 85 : 586-592.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Ophir, Y. and Beer, S.V.** (1996). Antagonist of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot pear under controlled environment conditions. *Phytopathology* 86 : 856-863.
- Montesinos, E., Llorente, I., Moragrega, C., Bonaterra, A., Cervantes, J. and Vilardell, P.** (1996). Desarrollo y evaluación a escala productiva de un sistema de control racional de la estemfiliosis del peral. *Fruticultura profesional* 78 : 96-104.
- Parrón, D.** (2000). Avaluació de l'eficàcia de diferents mètodes en la reducció del inòcul de *Pleospora allii* pel control de l'estemfiliosi de la perera. Treball final de carrera, Girona. Universitat de Girona, 2000.
- Prados-Ligero, A.M., Melero-Vara, J.M., Corpas-Hervías, C. and Basallote- Ureba, M.J.** (2002). Relationships between weather variables, airborne spore concentrations and severity of leaf blight of garlic caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 109 : 301-310.

- Ponti, I., Cavanni, P. and Brunelli, A.** (1982). Maculatura bruna della pera : Etiologia e difesa. L'informatore fitopatologico 3 : 35-40.
- Ponti, I. and Laffi, F.** (1988). Malattie crittogamiche delle piante da frutto. L'informatore agrario. Verona : 85-88.
- Rossi, V., Patteri, E., Giosué, S. and Bugiani, R.** (2004). Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of Brown spot of pear, on herbs plants of orchard lawns. European Journal of Plant Pathology 111 : 361-370.
- Rossi, V., Bugiani, R., Giosué, S. and Natali, P.** (2005). Patterns of airborne conidia of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot disease of pears, in relation to weather conditions. Aerobiologia 21 : 203-216.
- Sosa-Alvarez, M., Madden, L.V. and Ellis, M.A.** (1995). Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. Plant disease 79 : 609-615.
- Vilardell, P.** (1988). *Stemphylium vesicarium* en plantaciones de peral. Fruticultura profesional 18 : 51-55.