

Treball final de grau

Estudi: Grau en Enginyeria Agroalimentària

Títol: Avaluació d'agents de biocontrol basats en *Bacillus subtilis* i *Trichoderma spp.* en el control de la producció d'inòcul del fong *Stemphylium vesicarium* causant de l'estemfiliosi de la perera.

Document: Memòria

Alumne: Andrea Elias Laguna

Tutor: Isidre Llorente

Departament: EQATA

Àrea: Producció vegetal

Convocatòria (mes/any): Setembre del 2018

ÍNDEX

RESUM	3
PARAULES CLAU	4
AGRAÏMENTS	5
1. INTRODUCCIÓ	6
1.1. Estemfiliosi de la perera	6
1.1.1. Síntomes.....	7
1.1.2. Agent causant	8
1.1.3. Cicle biològic de la malaltia.....	9
1.2. Control de la malaltia	10
1.2.1. Control químic.....	10
1.2.2. Control mitjançant mètodes culturals	11
1.2.3. Control biològic	12
1.2.4. Determinació del potencial d'inòcul.....	13
2. OBJECTIUS	14
3. MATERIALS I MÈTODES	15
3.1. Situació i emplaçament dels assajos	15
3.2. Mètodes de captura d'inòcul d'<i>S. vesicarium</i>	16
3.3. Preparació per a l'obtenció de l'inòcul	16
3.4. Inoculació d'<i>S.vesicarium</i>	18
3.5. Tractaments amb agents de biocontrol	19
3.5.1. Preparació soques B59 i B128.....	19
3.5.2. Preparació dels agents de biocontrol comercials	19
3.6. Disseny experimental	20
3.6.1. Aplicació dels agents de biocontrol	20
3.7. Mètode de captura estàtic	21
3.8. Mètode de captoespores pluviomètric	23

3.9. Tractament estadístic de les dades	25
4. RESULTATS	26
4.1. Mesura de l'inòcul utilitzat capturadors estàtics	27
4.1.1. Dades globals del mètode estàtic	28
4.1.2. Primera lectura (06/04/2018).....	29
4.1.3. Segona lectura (27/04/2018).....	30
4.1.4. Tercera lectura (07/05/2018).....	31
4.1.5. Quarta lectura (16/05/2018)	33
4.1.6. Cinquena lectura (18/06/2018).....	34
4.2. Mesura de l'inòcul utilitzant capturadors dinàmics.....	35
4.2.1. Dades globals del mètode captoespores pluviomètric	37
4.2.2. Primera lectura (06/04/2018).....	38
4.2.3. Segona lectura (10/04/2018).....	39
4.2.4. Tercera lectura (07/05/2018).....	40
4.2.5. Quarta lectura (16/05/2018)	42
4.2.6. Cinquena lectura (18/06/2018).....	43
5. DISCUSSIÓ	44
6. CONCLUSIONS	47
7. BIBLIOGRAFIA.....	48

RESUM

L'estemfiliosi o taca marró de la perera és una malaltia causada pel fong *Stemphylium vesicarium*. Els símptomes que presenta la malaltia provocada pel fong *S. vesicarium* són una sèrie de taques necròtiques localitzades en els fruits, fulles, pecíols i tiges. Les pèrdues de producció a causa d'aquesta malaltia tenen un gran impacte econòmic.

S'ha comprovat una reducció de l'inòcul i els nivells de malaltia mitjançant mètodes de sanejament. Aquests mètodes es basen en combinacions d'eliminació de fulles en el sòl durant l'hivern i aplicacions d'agents de control biològic a finals d'hivern, primavera i estiu. El control de l'inòcul del patogen és molt important en una estratègia de protecció integrada.

L'objectiu d'aquest treball consisteix a determinar l'eficàcia d'agents de biocontrol basats en *Bacillus subtilis* (Serenade MAX, Serenade ASO, B59, B128) *Trichoderma spp.* (Tusal i Trianum) en la producció d'inòcul d'*S.vesicarium* i l'avaluació de diferents mètodes de captura.

Per dur a terme aquest objectiu es van inocular fulles de perera (extretes d'una finca experimental) , i es va posar en funcionament dos tipus de mètodes de captura dels quals es compararan els resultats. El primer mètode es basava en la captura d'inòcul amb portaobjectes instal·lats en unes caixes de fusta, i el segon mètode utilitzat va ser un captoesporos pluviomètric que es basa en el rentat dels conidis presents en les fulles per l'aigua de pluja. L'assaig es va realitzar en una finca experimental ubicada en el campus de Montilivi de la Universitat de Girona (UdG) durant els mesos de març fins al juny.

Els dos mètodes han estat eficaços en la captura de l'inòcul. L'agent de biocontrol Serenade MAX formulat a base de *Bacillus subtilis* ha reduït significativament la producció d'inòcul d'*S.vesicarium*. Els agents de biocontrol basats en *Trichoderma spp.* també han presentat una eficàcia molt alta en la disminució d'aquest inòcul (semblant al Serenade MAX), en el cas del mètode portaobjectes, però menor amb el mètode pluviomètric. La resta dels agents avaluats han mostrat una menor eficàcia.

PARAULES CLAU

- *Stemphylium vesicarium*.
- *Estemfiliosi*.
- *Bacillus subtilis*.
- *Trichoderma*.
- *Pleospora allii*.
- Inòcul.
- Agent de biocontrol.

AGRAÏMENTS

Aquest projecte no hauria estat possible sense l'ajuda d'un seguit de persones i organismes que m'agradaria donar les gràcies.

Primer de tot, vull mencionar al meu tutor, l'Isidre Llorente va ser ell qui em va motivar a escollir un tema relacionat amb el món vegetal i qui em va conduir cap a un treball ple de noves experiències i coneixements propis en el món de la perera. També agrair-li totes les hores de dedicació i l'atenció que ha tingut sobre aquest projecte.

Aquest projecte s'ha elaborat en el marc del projecte en recerca aplicada en producció agroalimentària ecològica (exp n. 53050082017) del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya.

Agrair a l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA) i al departament d'EQATA i a la Universitat de Girona pel material i les instal·lacions per poder dur a terme aquest assaig i elaborar aquest Treball Final de Grau.

Vull donar les gràcies a l'Alba Carmona, pel seguiment continuat que m'ha proporcionat, mostrant interès i donant-me un cop de mà en els moments més delicats del projecte.

I també al senyor Josep Pereda per la seva ajuda en l'obtenció del material del projecte.

A la meva família pel suport que m'han donat en els moments més dèbils, i als meus amics i amigues per tots els consells que m'han donat, gràcies.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Estemfiliosi de la perera

L'estemfiliosi o taca bruna és una de les malalties d'origen fúngic amb més importància econòmica en el cultiu de la perera.

Les àrees més afectades a Europa inclouen les regions d'Emilia-Romagna (on es va detectar per primera vegada el 1975). Es va anomenar aleshores “ maculatura bruna del pero” (Cavanni i Ponti, 1994). La malaltia es va estendre per la costa del Mediterrani, pel sud de França per la Vall del Ródan (Batllori,1984; Blancard et al.,1989). A Catalunya aquesta malaltia va ser detectada per primera vegada l'any 1984 en pereres de les varietats Passe Crassane i Conference (Vilardell,1988).

Avui en dia l'estemfiliosi s'ha estès als països d'Itàlia i Espanya (Catalunya, Euskadi i La Rioja), i també a altres zones d'Europa, com Portugal, al nord d'Europa, els Països Baixos i Bèlgica, s'està convertint amb una malaltia amb un fort impacte econòmic en els camps de perera (Llorente i Montesinos et al, 2006) (Figura 1).



Figura 1 : Localització de les àrees afectades per l'estemfiliosi de la perera a Europa (Llorente i Montesinos ,2006).

1.1.1. Síntomes

Els símptomes que representa la malaltia provocada pel fong *S. vesicarium* són una sèrie de taques necròtiques localitzades en els fruits, fulles, pecíols i tiges (figura 2).

Els primers símptomes apareixen en les fulles a finals d'abril, mentre que en els fruits apareixen a finals de maig i durant el mes de juny. Inicialment, les taques en fruits joves són circulars, marrons, amb una mida aproximada de 1-2 mm de diàmetre i a vegades estan envoltades d'un halus vermell. Després, comencen a manifestar-se en fruits madurs, les taques augmenten de grandària fins a 10 vegades la seva mida inicial, els símptomes en fulles consisteixen en taques marrons, de 1-3 mm de diàmetre, que són observades des de finals d'abril fins al juny (Llorente i Montesinos, 2006; Llorente et al. 2012).



Figura 2: Síntomes de la taca bruna de la perera en (A) fruits i (B) fulles de la perera (Llorente 2006).

1.1.2. Agent causant

La taca bruna de la perera o l'estemfiliosi és una malaltia causada per un fong deuteromicet anomenat *Stemphylium vesicarium*, es caracteritza per tenir els conidis de color foscos, ovalats i pluricel·lulars (figura 3), els conidis presenten entre 1 a 5 septes transversals i entre 1 a 2 septes longitudinals, aquests conidis tenen mida variable però es troben en un rang comprès entre 21 a 48 µm de llargada i de 10 a 22 µm d'amplada. El miceli és filamentós, dispers i hialí, mentre que els conidiòfors són erectes, marrons i amb un sol conidi terminal (Llorente i Montesinos,2006).

El teleomorf d'*S.vesicarium* correspon a l'ascomicet *Pleospora allii*, que produeix pseudotecis marrons i negres, el·lipsoïdals o oblongues. La mida dels pseudotecis solen estar entre uns diàmetres que van dels 100 a 500 µm. La forma dels ascis són cilíndriques, amb una mida de 131x26 µm, en el seu interior contenen vuit ascòspores, aquestes són d'un color groguenc-marronós, el·lipsoïdals, amb una mida aproximadament de 32x14 µm, contenen entre 3 i 7 septes transversals i un septe longitudinal (Llorente i Montesinos,2006).

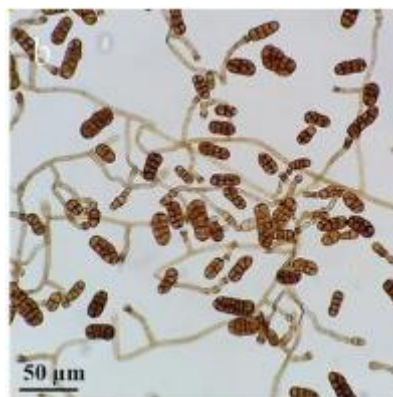


Figura 3 : Conidis de *Stemphylium vesicarium* (INTEA).

1.1.3. Cicle biològic de la malaltia

El cicle de la malaltia es divideix en dues fases: 1) la fase sapròfita en la qual el fong creix sobre les restes vegetals de la planta (durant tot l'any) i 2) una fase patogènica sobre els òrgans aeris de la perera durant el període de creixement (primavera i estiu), l'agent causant de la malaltia produeix dos tipus d'inòcul: Les ascòspores sexuals constituïts per *P. allii*, produïda principalment des de finals d'estiu fins a principis de tardor a les restes de fulles i fruits caiguts a terra, i la fase asexual corresponent a conidis d'*S.vesicarium*. que constitueix la fase infectiva predominant en condicions ambientals favorables infectant els diferents òrgans de la planta a l'època vegetativa (Llorente et al., 2012).

Com s'ha explicat anteriorment, el període de producció d'ascòspores de *P.allii* es produeix entre els mesos de febrer i juny, i el segon període entre agost i octubre, aquestes ascòspores poden ser patògens en la perera, tot i això el seu paper més important consisteix a iniciar una colonització sapròfita a les restes vegetals dels camps de perera (Llorente i Montesinos,2006). Posteriorment en aquestes restes vegetals es produeixen conidis d'*S. vesicarium*. La presència o l'impacte d'aigua lliure juntament amb l'efecte del vent ajuda a l'alliberació i a la dispersió d'aquests conidis, un cop disposats als òrgans de la planta i quan les condicions siguin favorables, s'iniciarà la germinació d'*S.vesicarium*, aquests conidis seran els responsables de les infeccions, durant el període de desenvolupament de la perera (Llorente i Montesinos 2006; Llorente et al. 2010b, Llorente, 2012; Rossi et al.,2005b,2008).

La maduració de *P.allii* durant l'hivern i la primavera requereixen unes bones condicions, com humitats elevades amb més del 98%, i una temperatura mínima entre 10 i 15 ° C, mentre que les taxes de maduració disminueixen quan les temperatures són de 5 ° C o més baixes (Llorente et al., 2006).

Tots dos tipus d'inòculs (ascòspores de *P.allii* i conidis d'*S.vesicarium*) són capaços de produir infeccions sobre fruites i fulles de la perera, però la majoria d'infeccions són produïdes per conidis. La temperatura òptima per a la germinació dels conidis oscil·la entre 20 i 30 ° C, amb una velocitat de germinació molt ràpida (Llorente et al, 2006).

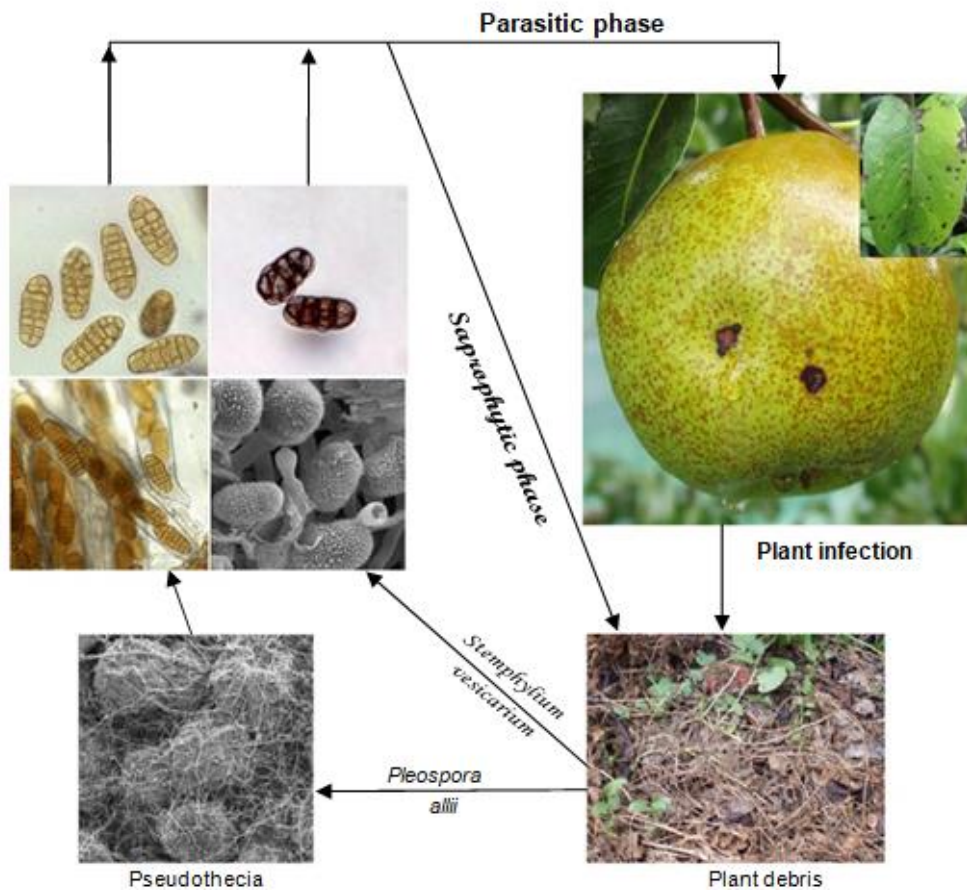


Figura 4: Cicle biològic de *Stemphylium vesicarium* i *Pleospora allii* (Llorente et al.,2012).

1.2. Control de la malaltia

Hi ha diferents estratègies i mètodes per al control de la malaltia. S'han de tenir diversos aspectes presents: l'ambient, l'hoste, el patogen i la interacció entre ells.

1.2.1. Control químic

El control químic redueix la infecció d'*S.vesicarium* en els camps de perera, es basa en l'aplicació preventiva de fungicides, com ditiocarbamats (thiram,mancozeb), dicaboximides (procymidona) i estrobilurines. Aquest es basa en l'aplicació entre intervals de 7-14 dies o seguint el model de predicció BSPcast (sistema pel tractament racionalitzat de l'estemfiliosi de la perera), que es regeix per la temperatura i la durada del període d'humectació foliar.

La seva aplicació és realitzada després de la caiguda dels pètals de les flors i acaba uns dies previs de la collita del fruit. El criteri de selecció dels fungicides a utilitzar per al control de la taca bruna varia en funció del país i de les zones de producció, però normalment l'elecció d'un fungicida o altre es basa en la seva activitat, i en la seva eficàcia en relació a l'estat fenològic de la planta.

La utilització d'aquests té una eficàcia moderada en el control de la malaltia i cal tenir en compte que des de l'inici de la floració fins a la seva recol·lecció caldria realitzar entre 15 i 25 tractaments, segons el fungicida, per mantenir els nivells comercialment acceptables de pèrdues per malalties. Fins i tot es pot arribar a la selecció de soques resistents del patogen a diferents compostos químics, per exemple, a les estrobilurines. Per evitar-ho cal alternar famílies de fungicides amb, mecanismes d'acció diferents. Tot i això, els fungicides no són prou efectius i la malaltia no sempre es redueix a nivells econòmicament acceptables, a més aquest ús elevat de fungicides no es mediambientalment sostenible i la qualitat del producte disminueix a causa de la presència de residus (Llorente i Montesinos, 2006; Llorente et al, 2012).

1.2.2. Control mitjançant mètodes culturals

El control sanitari consisteix en la trituració o eliminació de restes vegetals del sòl per interrompre el cicle biològic del patogen, això ha permès reduir el nombre d'ascòspores de l'inòcul primari.

Per evitar que la malaltia es pugui propagar amb facilitat s'intenta aconseguir varietats amb poca sensibilitat o tolerants a la malaltia, però no sempre és possible, ja que aquestes no tenen interès comercial. A més existeix una variació en la susceptibilitat en funció de la fenologia, les varietats de Passe Crassane i Conference disminueix la sensibilitat de la malaltia a mesura que aquests maduren (Llorente i Montesinos, 2006).

Altres mètodes culturals que poden afectar a la incidència de la malaltia és la irrigació per aspersió, ja que la presència d'aigua en les fulles (humectació) afavoreix a la germinació del patogen, i a mantenir un bon estat nutricional de la planta, així s'aconsegueix augmentar en cert grau la resistència (Llorente i Montesinos, 2006; Llorente et al, 2012).

1.2.3. Control biològic

El control biològic va ser originalment definit com: l'acció de paràsits, depredadors o patògens que mantenen poblacions d'altres organismes a un nivell més baix del que podria haver-hi en la seva absència (DeBach, 1964).

Aquest fenomen natural de regulació de plagues manejat per l'home a través de la intervenció d'agents de control biològic, plantes i herbívors proveïts de bases Ecològiques es va donar a conèixer en la dècada dels 70 del segle passat com a Maneig Integrat de Plagues (MIP) (van des Bosch et al., 1982). L'Organització Internacional de Lluita Biològica (OILB) defineix el control biològic com "la utilització d'organismes vius, o dels seus productes, per evitar o reduir les pèrdues o perjudicis causats pels organismes nocius". Des d'aquest punt de vista s'inclouen en aquest concepte no només els parasitoides, depredadors i patògens d'insectes i àcars, sinó també el de fitòfags i patògens així com feromones, hormones juvenils, tècniques autòcides i manipulacions genètiques (Pérez, 2004).

En el cas de la perera s'han avaluat diversos agents de control biològic per al control de malalties sobre fulles i fruites en aquest cas contra *S.vesicarium*, la combinació de pràctiques culturals, inclosa l'eliminació de restes vegetals de perera, amb dues o tres aplicacions de *Trichoderma spp.* de febrer a abril disminueix la malaltia, arribant a un 30% més a l'hora de la recol·lecció (Llorente et al,2010a,b).

A més, els tractaments amb *Trichoderma spp.* durant la temporada de creixement, van reduir els conidis d'*S. vesicarium* sobre les restes vegetals de les fulles de perera en més del 99% sis setmanes després de la seva aplicació (Rossi i Patteri, 2009). Els mecanismes d'acció de *Trichoderma spp.* són varis i bàsicament són el parasitisme i la formació de biomolècules actives contra els fongs fitopatògens (Harman, 2005).

Un altre grup d'agents de biocontrol és la utilització de *Bacillus subtilis*, que és un bacteri de gram positiu de la família *Bacillaceae*, produeix una gran quantitat de lipopèptids, metabòlits primaris o secundaris, amb ampli espectre antibiòtic. Certs metabòlits són supressors efectius d'alguns patògens de les plantes (Ariza i Sánchez,2012).

El seu potencial, es basa en la seva capacitat per produir un ampla gamma de compostos bioactius, que mostren propietats antifúngiques amb una baixa toxicitat i bones característiques mediambientals en comparació amb els productes químics, segrega proteïnes amb propietats antifúngiques. S'utilitza industrialment com a fungicida i insecticida (Subirats,2012)

1.2.4. Determinació del potencial d'inòcul

La determinació del potencial d'inòcul per mesurar els conidis i espores d'*S. vesicarium* i *P. allii* és clau en una estratègia de control integrat de malalties, es pot determinar amb els següents mètodes:

1. Amb l'historial de malaltia de la finca. Finques de perera amb problemes importants d'estemfiliosi l'any anterior és més probable que tinguin un potencial d'inòcul més gran.
2. Capturadors d'espores i/o conidis
 - Tipus Burkard o Lanzoni, aparells que succionen l'aire a velocitat constant i fa que les partícules en l'aire impactin en una cinta en moviment constant, de manera que es quantifica el volum de partícules per volum d'aire i la dinàmica temporal de les captures amb una precisió horària (Rama,2013).
 - Rotorods, són sistemes dinàmics on els conidis o espores impacten en una superfície rectangular d'unes varetes que giren en un moviment rotacional a una velocitat constant. Es pot determinar la concentració d'inòcul però no l'hora exacte d'emissió.
 -
3. Extracció al laboratori d'espores/conidis

Extracció d'ascòspores i conidis d'*S. vesicarium*/*P. allii* procedents del material vegetal del camp, aquesta extracció es fa al laboratori i hi ha diferents protocols per fer-ho, el mètode de Crété és un dels més utilitzats (Rama,2013).

4. Mostrejadors estàtics

Els conidis o ascòspores cauen per gravetat o impacte en dispositius com són portaobjectes amb substàncies adhesives instal·lats al camp (Rama,2013). Es mesura la concentració relativa d'inòcul.

2. OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest treball consisteix en determinar l'eficàcia d'agents de biocontrol basats en *Bacillus subtilis* i *Trichoderma spp.* en la producció d'inòcul d'*Stemphylium vesicarium* .

Els objectius concrets d'aquest treball són :

1. Determinar l'eficàcia dels agents de biocontrol aplicats basats en *Bacillus subtilis* (B59,B128, Serenade ASO, Serenade MAX) i *Trichoderma spp* (Tusal i Trianum) en la producció inòcul d'*S. vesicarium*.
2. Avaluar un mètode estàtic de captura d'inòcul (portaobjectes) i un mètode de captura dinàmica (pluviomètric).

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Situació i emplaçament dels assajos

En aquest treball es van realitzar dos assajos en una finca experimental ubicada en el campus de Montilivi com es pot observar en les figures 5 i 6. En aquesta finca experimental hi ha ubicada una estació agrometereològica (model CR10X, Campbell Sientific Ltd i sensors de temperatura, humitat relativa, humectació, direcció i velocitat del vent i precipitacions).

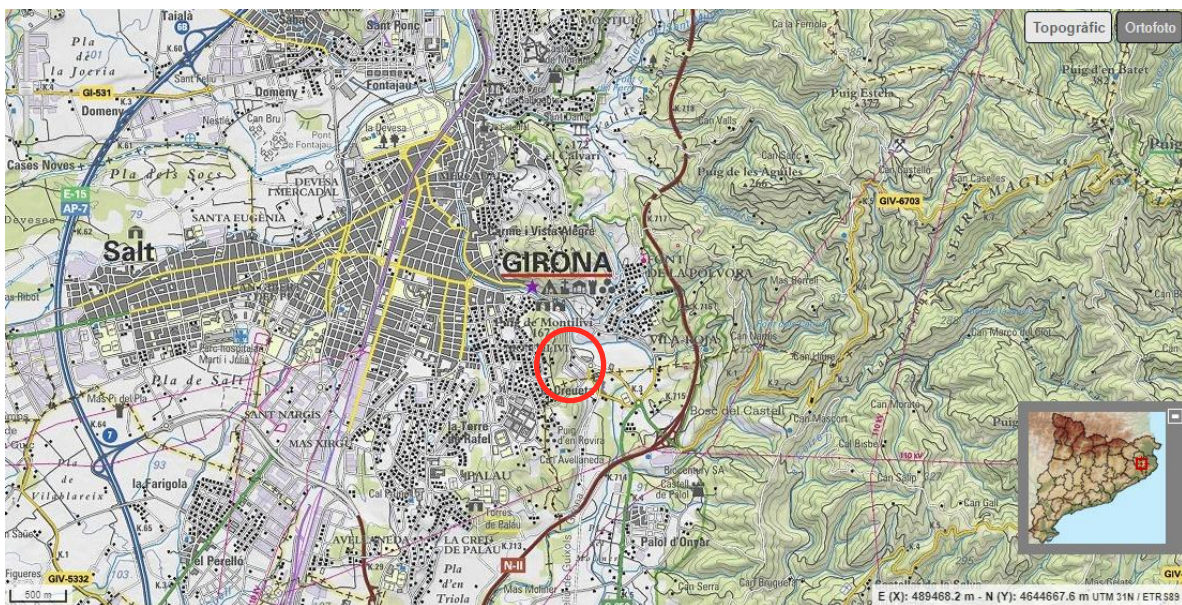


Figura 5 : Situació (ICGC-Vissir).



Figura 6: Emplaçament (ICGC-Vissir).

3.2. Mètodes de captura d'inòcul d'*S. vesicarium*

En aquest treball es van valorar dos mètodes de captura de conidis d'*S.vesicarium*. El primer mètode es basa en un mostrejador estàtic (portaobjectes), i el segon mètode de tipus dinàmic es tracta d'un captoespores pluviomètric que recull el rentat de l'aigua de pluja.

3.3. Preparació per a l'obtenció de l'inòcul

Abans de posar en marxa els mètodes de mostreig, es van inocular artificialment fulles de perera de la varietat Passe crassane obtingudes d'una finca experimental amb nivells alts d'estemfiliosi. Tot i això, per assegurar la colonització d'aquest material vegetal, les fulles es van inocular amb la soca EPS26 d' *S.vesicarium*.

Per a l'obtenció d'aquest inòcul es van preparar 40 plaques petri amb medi agar V-8 (figura 7). Posteriorment es van sembrar amb la soca EPS26 d'*S.vesicarium* i es van incubar a una temperatura de 22,4 °C i fotoperíode (I-30BLL Percival plant Biology Chamber, Percival Scientific Inc., USA) durant 11 dies. Després d'aquests 11 dies, per extreure els conidis dels cultius (figura 8) es van fer rentats de totes les plaques fetes anteriorment amb un volum de 2-5 ml d'aigua destil·lada estèril/placa amb l'ajuda d'una nansa Digralsky i es va filtrar la suspensió obtinguda utilitzant un tamís de 0.2 mm de diàmetre de porus en un vas de precipitat (figura 9).



Figura 7: Preparació de 40 plaques amb medi V-8.

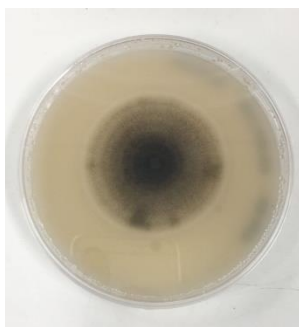


Figura 8: Mostra placa inoculada d'*S.vesicarium* després de 11 dies.

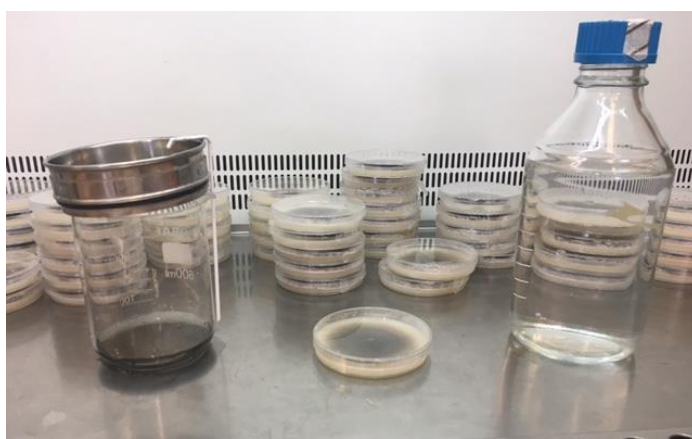


Figura 9: Preparació de la suspensió de conidis.

Finalment la concentració de la suspensió va ser determinada a partir d'una cambra hemacitomètrica tipus Thoma, es va obtenir una solució de 800 ml de 1.8×10^5 conidis/ml mantinguda a una temperatura mínima de 4 graus (figura 10).



Figura 10: Suspensió de 800 ml.

3.4. Inoculació d'*S.vesicarium*

Un cop es va obtenir la suspensió, es va procedir a la inoculació de les fulles extretes d'una finca experimental com s'ha comentat anteriorment, primerament es van expandir per terra a sobre d'una làmina de plàstic, i amb l'ajuda d'un polvoritzador de pressió manual es va inocular el patogen mullant completament les fulles (figura 11).



Figura 11: Inoculació de les fulles amb una suspensió d'*S.vesicarium*.

Finalment aquestes fulles, abans de ser tancades en bosses de plàstic, es varen barrejar bé per aconseguir una bona homogeneïtat i seguidament es van deixar incubar durant 48 hores a l'interior d'una cambra d'ambient controlat (Convicon PGR 15, Winnipeg Manitoba, Canadà), amb les condicions de 22,5 °C i foscor (figura 12). Passades les 48 hores aquestes fulles inoculades es van portar a la finca experimental on es van distribuir en els dispositius dels 2 assajos: mètode de captura estàtic (portaobjectes) i mètode de captura dinàmic (pluviomètric).



Figura 12: Fulles de perera inoculades amb *S. vesicarium*.

3.5. Tractaments amb agents de biocontrol

En aquest projecte es van avaluar sis agents de biocontrol basats en *Bacillus subtilis* i *Trichoderma spp.* pel que fa als *Bacillus subtilis* hi havia dues soques experimentals de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (UdG) el B59 i B128, i dos productes comercials: Serenade MAX i Serenade ASO. Pel que fa a l'agent de biocontrol *Trichoderma spp.* es van utilitzar dos productes comercials: Tusal i Trianum.

3.5.1. Preparació soques B59 i B128

Per la preparació de les suspensions de les dues soques de *B. subtilis* no comercials es van agafar plaques petri amb medi LB amb colònies crescudes de B128 i B59 i d'aquestes es va extreure una colònia de cada placa, posteriorment es van passar a tubs de 10 ml amb medi LB líquid, i es varen mantenir aquests tubs 20 hores en agitació a 110 rpm. Un cop passades aquestes hores, per conèixer la concentració aplicada per cada soca es va fer un banc de dilució, un cop elaborades les dilucions es va sembrar en plaques de LB sòlid, un per cada soca, la sembra es va fer mitjançant gotes de 20µl, es van sembrar les gotes de les dilucions 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , i 10^{-6} amb dues repeticions de cada. Passades 24 h es recomptaven les colònies i una vegada coneguda la concentració es van utilitzar 12 plaques de cada soca, que asseguraven una concentració de 1×10^8 ufc/ml.

3.5.2. Preparació dels agents de biocontrol comercials

Tusal

Aquest preparat conté una barreja de *Trichoderma atroviride* (anteriorment *T. harzianum*) 0.5 % (1×10^8 ufc/g) p/p i *Trichoderma asperellum* (anteriorment *T. viride*) 0.5% (1×10^8 ufc/g) p/p (WG) comercialitzada per Newbiotechnics N.B.T. Es va aplicar a duna dosi de 2 g Tusal/l

Trianum

El producte Trianum esta compostat per *Trichoderma harzianum rifai* 1 % p/p (1×10^9 ufc/g)(WG) p/p, comercialitzat per Koppert b.v. Es va aplicar a duna dosi de 2 g Trianum/l

Serenade MAX

És un producte d'origen natural compostat per *Bacillus Subtilis*, 15.67 % p/p ($5,13 \times 10^{10}$ ufc/g), formulat com a pols mullable, comercialitzat per Bayer Cropscience, S.L Es va aplicar a una dosi de 4 g Serenade Max/l

Serenade ASO

Compostat per *Bacillus Subtilis*, 15.67 % p/p ($1,042 \times 10^{12}$ ufc/l), comercialitzat per Bayer Cropscience, S.L. Es va aplicar a una dosi de 9.3 ml Serenade Aso/l

3.6. Disseny experimental

Es van assajar, per tant, 7 tractaments (B59, B128, Serenade ASO, Serenade MAX, Triatum i Tusal, més un control no tractat). L'eficàcia d'aquests tractaments es va mesurar a partir dels conidis capturats utilitzant dos mètodes: mètode estàtic (portaobjectes) i mètode dinàmic (pluviomètric). Els assajos fets per cada mètode de captura van ser independents, és a dir, es realitzaven separatament i utilitzant material vegetal inoculat diferent. En els dos casos el disseny experimental va consistir en blocs aleatoritzats, amb 3 blocs per cada tractament.

3.6.1. Aplicació dels agents de biocontrol

Els agents de biocontrol avaluats van ser aplicats a partir de la informació obtinguda en les prediccions de risc d'infecció generat pel model BSPcast, ja que anteriorment s'havia vist que aquest model també és un bon indicador per determinar els períodes d' esporulació d'*S. vesicarium*, realitzant un màxim d'un tractament per mes. Els tractaments es varen fer manualment amb l'ajuda d'un polvoritzador pressuritzat a diferents dates (Taula 1) els agents de biocontrol comercials es van aplicar considerant per una banda les prediccions del risc d'infecció i per altra les característiques dels agents de control biològic. Les soques B59 i B128 es van aplicar només una vegada. El volum utilitzat va ser de 350 ml en l'assaig amb capturadors estàtics i 75-100 ml en l'assaig amb capturadors pluviomètrics.

Taula 1 : Tractaments aplicats durant l'assaig.

	B59	B128	Serenade ASO	Serenade MAX	Tusal	Triatum
23/03/2018						
05/04/2018						
11/05/2018						
06/06/2018						

	Tractats
	No tractats

3.7. Mètode de captura estàtic

Aquest mètode es basa en la col·locació de portaobjectes a prop de la font d'emissió d'inòcul. Es van utilitzar caixes de fusta clavades a terra de dimensions 30x30x15 cm, a l'interior d'aquests dispositius es van col·locar 350 grams de material vegetal (fulles inoculades amb *S.vesicarium* veure apartat 1.4) tapades amb una reixa per evitar que el vent disminueixi el volum del material vegetal. Els portaobjectes van ser col·locats horitzontalment a sobre dels dispositius amb la cara inferior impregnada de silicona.

En total hi havia 21 caixes instal·lades dividides en 3 blocs havent-hi 7 caixes per bloc (figura 13).

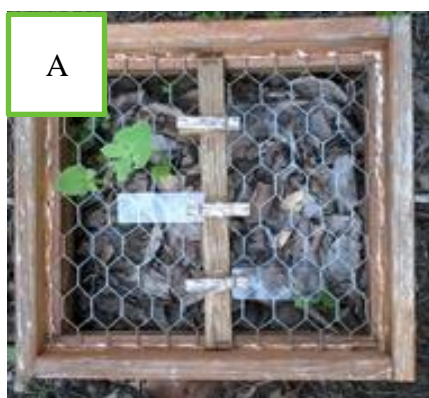


Figura 13: (A) Caixa de fusta situat a la parcel·la experimental del campus de Montilivi de la UdG **(B)** Disposició de les caixes.

Periòdicament (cada 15 dies aproximadament) es canviaven els portaobjectes per uns de nous, els que havien estat a camp es portaven al laboratori i es fixaven amb gelatina tenyida amb fucsina àcida, i s'afegia un cobreobjectes. (figura 14).

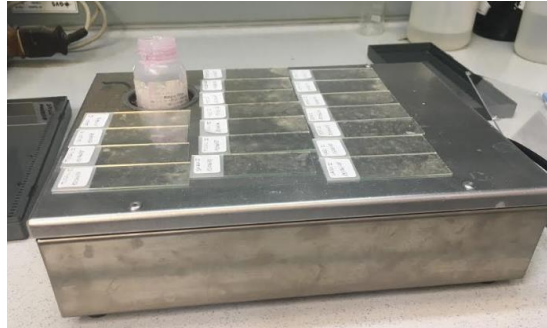


Figura 14: Placa calefactora amb mostres fixant-se.

Un cop obtingudes les mostres es portaven al laboratori i s'observaven al microscopi òptic i es determinava el nombre de conidis d'*S.vesicarium* capturats (figura 15). Per saber el nombre de conidis, es mostrejava un transsecte longitudinal de cada portaobjectes sota microscopi òptic a 200X i es contaven la totalitat de conidis d'*S.vesicarium* capturats. Coneixent l'àrea mostrejada (39.91 mm²) es determinava el nombre de conidis/cm².



Figura 15: Mostra de conidis d' *S.vesicarium* visualitzats amb el microscopi òptic a 200X en una de les observacions amb el mètode de portaobjectes.

Aquest assaig es va iniciar el dia 23 de març del 2018 i va finalitzar el dia 18 de juny del 2018 , en total es van fer 5 lectures de cada tractament. Hi havia un total de 7 tractaments i 3 repeticions/tractament amb dos portaobjectes, això equival a un total de 210 transsectes observats al microscopi.

3.8. Mètode de captoespores pluviomètric

Aquest mètode es basa en el rentatge dels conidis presents en les fulles per l'aigua de pluja. Es va incorporar el material vegetal inoculat (fulles de perera, veure apartat 1.4) dins d'unes malles en forma de triangle, per tal d'evitar pèrdues aquestes malles eren tancades pels extrems. El material vegetal es posava dins un embut de plàstic, de manera que l'aigua de pluja es recollia en ampolles d'un volum de 750 ml, tot i que es van canviar per unes de 1.000 ml, ja que les altres s'emplenaven més ràpidament. A cada ampolla s'hi afegien 2 ml de sulfat de coure per evitar la germinació dels conidis i inhibir el creixement de microorganismes, aquest muntatge es posava dins un tub de PVC (figura 16).

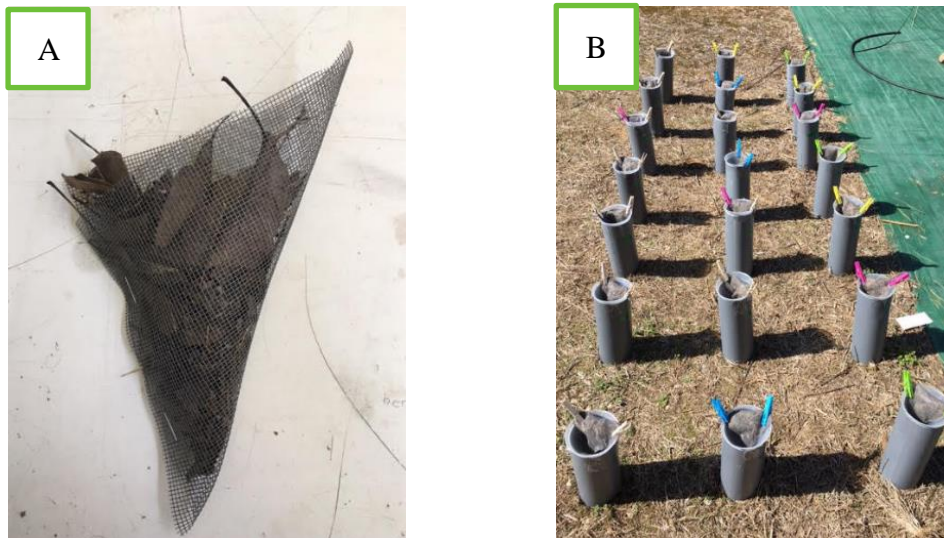


Figura 16: (A) Malla amb material vegetal inoculat (B) Disposició dels embuts.

Periòdicament, en funció de la pluviometria, es reemplaçaven aquestes ampolles per altres i es portaven al laboratori. Una vegada al laboratori es posaven les ampolles a agitació a 100 rpm durant 30 minuts, es mesurava el volum total d'aigua de cada ampolla, es sacsejava vigorosament durant 30 segons i es filtrava amb una alíquota entre 50 i 90 ml mitjançant filtres millipore. Posteriorment els filtres s'analitzaven utilitzant un microscopi òptic a 200X. De cada filtre es van fer observacions de 4 transsectes de 0,55 mm, amb una àrea mostreja per transsecte de 36,28 mm². A partir d'aquest valor i coneixent l'àrea total del filtre (1385,45 mm²), a partir del volum de l'alíquota filtrat i el volum total capturat s'obtenien conidis d'*S.vesicarium*/ml (figura 17).

Aquest mètode de captura es va dur a terme de manera ininterrompuda entre el 23 de maig i el 18 de juny, en total es van realitzar 5 lectures de cada tractament, dels quals hi havia 7 tractaments amb 3 repeticions de cada, això equival a un total de 105 lectures observades al microscopi (analitzat en cada lectura 4 transsectes).

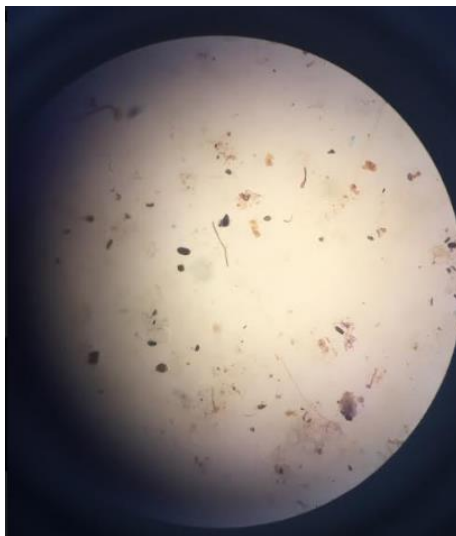


Figura 17: Mostra de conidis d' *S.vesicarium* visualitzada amb el microscopi a 200x en una de les observacions amb el mètode de captioespores pluviomètric .

3.9. Tractament estadístic de les dades

En l'assaig realitzat amb capturadors estàtics les dades analitzades van ser els conidis d'*S. vesicarium*/cm² i en l'assaig amb capturadors dinàmics el total de conidis d'*S. vesicarium* capturats. Les dades obtingudes en cadascun dels dos assajos es van analitzar separatament utilitzant el programari R (v.3.5.0.) (R Core Team, 2018). Es va avaluar la normalitat de les dades amb la prova de Shapiro-Wilk i l'homogeneïtat de les variàncies amb la prova de Bartlett. En els casos necessaris es van transformar les dades en el $\log_{10}(\text{conidis}+0.1)$. Per determinar l'efecte dels tractaments en l'inòcul capturat es va realitzar una Anàlisi de la Variància (ANOVA) i en el cas en què l'efecte era significatiu ($P < 0.05$) es va realitzar la prova de separació de mitjanes de Tukey. Les anàlisis es van fer separatament per cada data de mostreig i amb el global de conidis capturats durant tot l'assaig.

4. RESULTATS

L'objectiu d'aquest treball va ser conèixer la dinàmica d'emissions de conidis d'*S.vesicarium* durant tot el període d'assaig, i quin dels tractaments aplicats va ser el més eficaç en la reducció d'aquest inòcul. Els resultats es presenten per cada mètode de captura d'inòcul utilitzat. Pel que fa a les dades climàtiques durant el període d'assaig es pot observar (figura 18) que durant el mes d'abril les precipitacions van ser abundants arribant a un màxim de 55 mm amb temperatures entre 10 i 20 °C i amb humitats relatives altes a principis del mes, però molt baixes a finals del mes, al mes de maig el màxim va ser de 38 mm amb humitats relatives i temperatures constants, al mes de juny les precipitacions van disminuir arribant als 27 mm, la humitat va baixar i les temperatures van pujar.

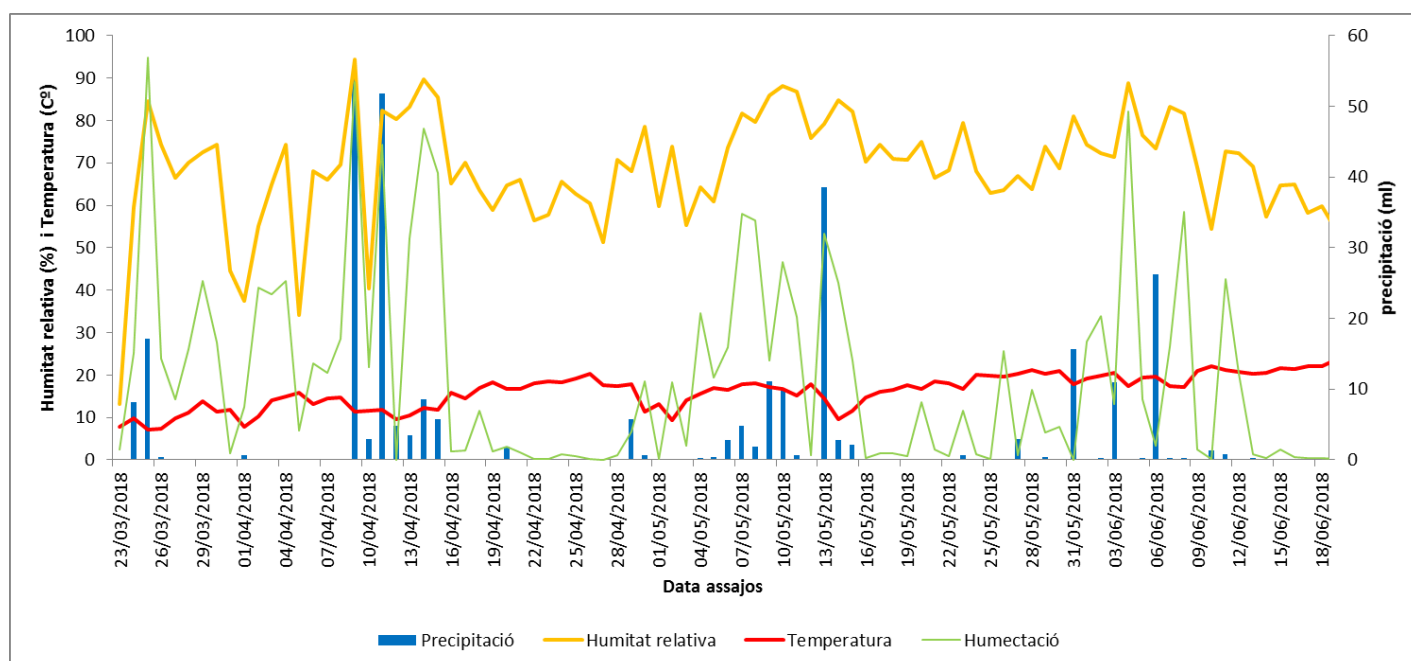


Figura 18: Paràmetres climàtics de pluviometria, humitat relativa, temperatura i humectació durant l'assaig.

4.1. Mesura de l'inòcul utilitzat capturadors estàtics

La mesura de l'inòcul alliberat es va fer amb el mètode de captura estàtic amb portaobjectes. Primerament es presenta l'anàlisi de les dades globals (total de conidis capturats per cada tractament al llarg de l'assaig) i seguidament l'anàlisi particular de cada data de lectura.

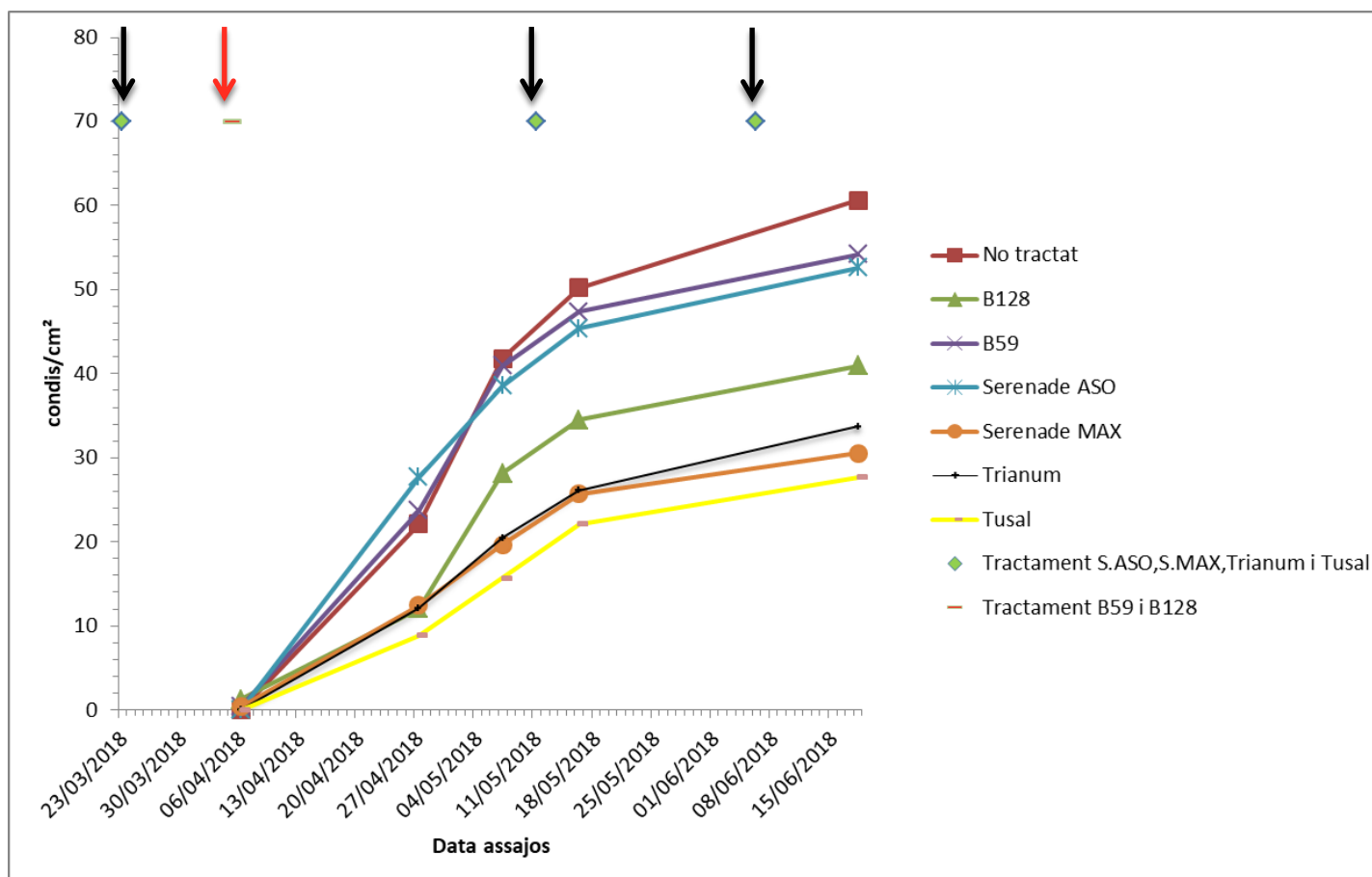


Figura 19: Dinàmica de les captures de conidis d'*S.vesicarium* acumulats en les 5 lectures realitzades per cada tractament amb el mètode estàtic.

En la figura 19, s'observa l'efecte dels ACB en la dinàmica de la producció d'inòcul expressats en nombre de conidis/cm², es van observar un total de 5 lectures, aparentment hi havia diferències entre tractaments. El primer tractament es va fer el 23/03/2018 dels productes comercials i el 05/04/2018 de les soques B128 i B59. A partir de la segona lectura ja s'apreciaven diferències de l'inòcul capturat pels diferents tractaments. A partir de la tercera lectura 27/04/2018, el grup que

mostrava més eficàcia sobre el control dels conidis hi havia el Tusal, Trianum i el Serenade MAX , també hi havia un grup intermedi que es va mantenir constant durant l'assaig: Serenade ASO i el B128, el B59, no demostrava diferències enfront del control.

4.1.1. Dades globals del mètode estàtic

Taula 2 : Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis ($\log_{10}(\text{conidis})$) capturats amb el mètode de portaobjectes segons l'anàlisi de la variància(ANOVA). Les dades corresponen al total de conidis capturats en les cinc lectures de l'assaig.

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	0,5919	0,09865	9,059	0,0000071
Blocs	2	0,0096	0,00478	0,439	0,648
Total	33	0,3594	0,01089		

Quan es van analitzar les dades globals obtingudes al final de l'assaig (Taula 2 i Figura 20) es va determinar que no hi havia diferències significatives entre els blocs, però l'efecte dels tractaments va ser significatiu (taula 2). S'observa que el nombre de conidis capturats en el control no tractat difereix dels capturats amb els tractaments Serenade MAX, Trianum i Tusal (figura 20) entre ells no presenten cap diferència significativa però sí de la resta dels tractaments: B59 i Serenade ASO.

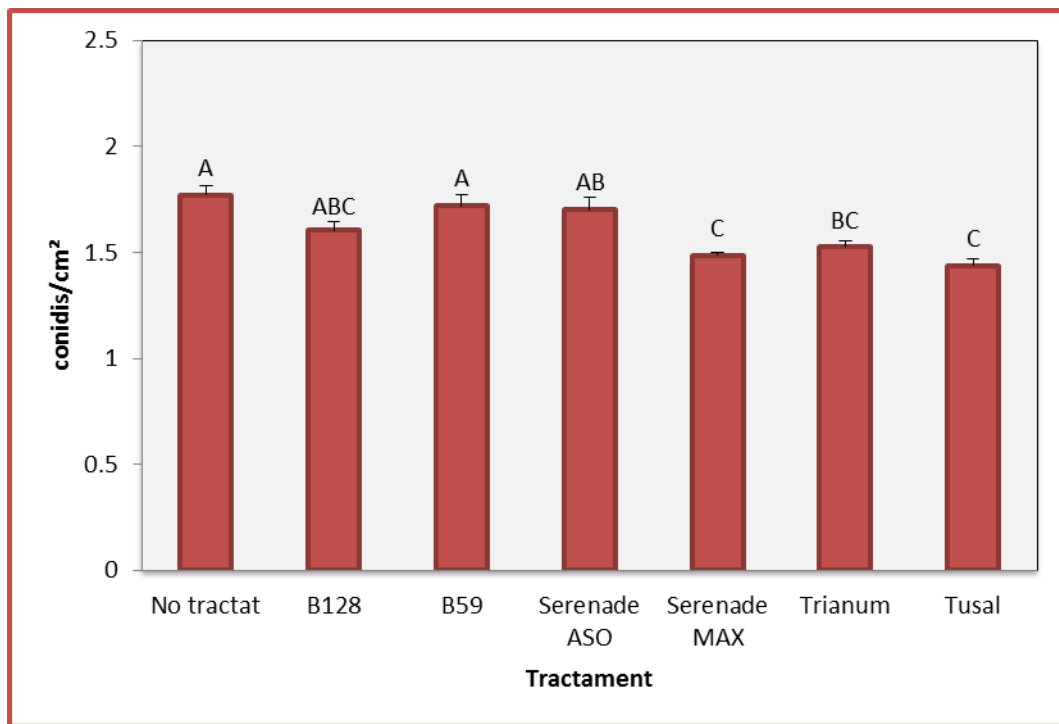


Figura 20: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de captura portaobjectes. Les dades corresponen al total de conidis capturats en les cinc lectures. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$).

A continuació es presentaran els resultats analitzats per cada data de lectura.

4.1.2. Primera lectura (06/04/2018)

A la primera lectura no hi va haver gairebé captures de conidis.

4.1.3. Segona lectura (27/04/2018)

A la segona lectura, es va avaluar el resultat obtingut passades dues setmanes des de l'inici de la inoculació. En la taula 3 s'observa com l'efecte dels tractaments és significatiu en la captura d'*S.vesicarium*, però el control no tractat no mostra diferències significatives amb la resta de tractaments excepte pel Serenade ASO, que redueix significativament el nombre de conidis/cm² capturats (figura 21) .

Taula 3 : Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis ($\log_{10}(\text{conidis})$) capturats amb el mètode de portaobjectes segons l'anàlisi de la variància(ANOVA). Les dades corresponen a segona lectura.

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	1,1333	0,18889	3,229	0,0132
Blocs	2	0,1603	0,08017	1,371	0,268
Total	33	1,9303	0,05849		

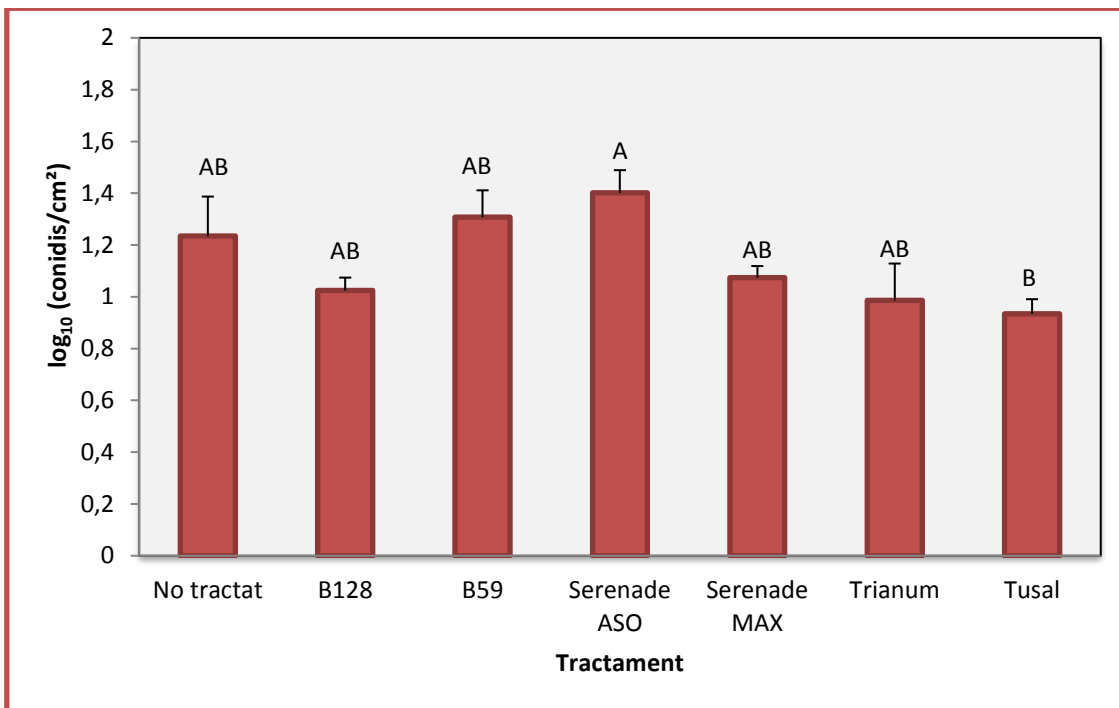


Figura 21: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de captura portaobjectes. Les dades corresponen al total de conidis capturats en la segona lectura. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$).

4.1.4. Tercera lectura (07/05/2018)

Taula 4 : Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis ($\log_{10}(\text{conidis})$) capturats amb el mètode de portaobjectes segons l'anàlisi de la variància (ANOVA). Les dades corresponen a la tercera lectura.

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	1,1974	0,19957	3,926	0,00454
Blocs	2	0,0075	0,00374	0,074	0,92925
Total	33	1,6773	0,05083		

Les dades obtingudes en la tercera lectura mostren que hi havien diferències significatives entre tractaments (taula 4). Es va determinar (figura 22) que l'inòcul capturat en el control no tractat va diferir de l'observat en els tractaments Serenade MAX i Tusal. Entre el Serenade MAX i el Tusal no hi havia cap diferència significativa. Malgrat això la resta de tractaments no difereixen del control no tractat ni del Serenade MAX i Tusal.

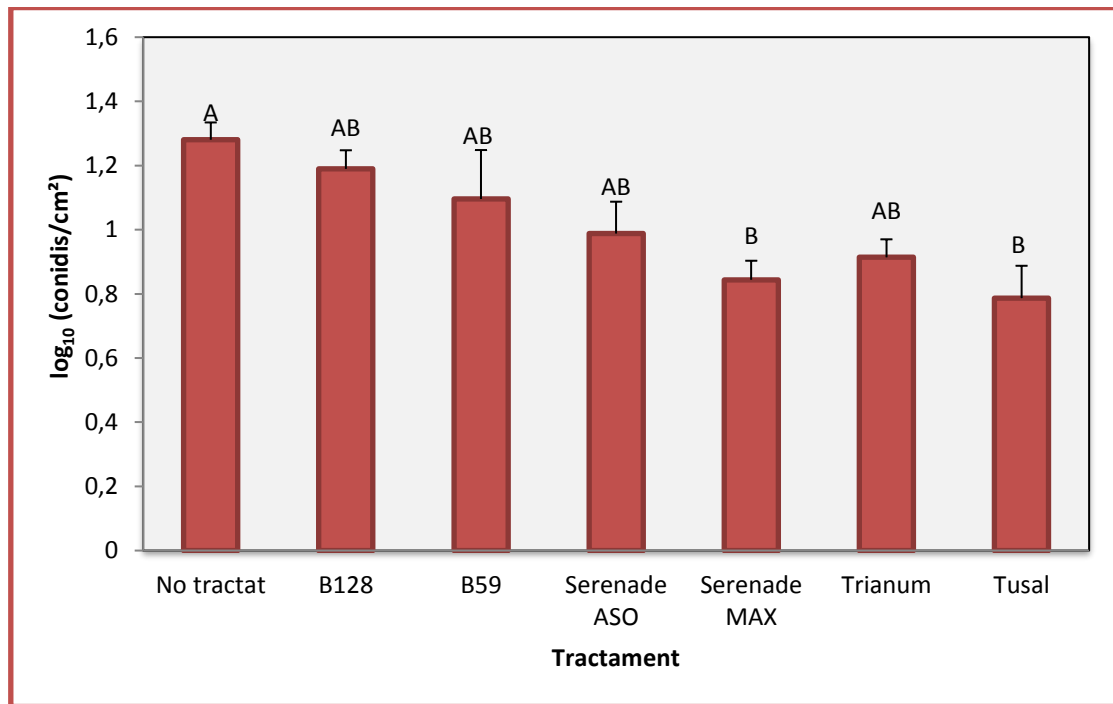


Figura 22: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de portaobjectes. Les dades corresponen a la tercera lectura. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$).

4.1.5. Quarta lectura (16/05/2018)

Taula 5 : Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis ($\log_{10}(\text{conidis})$) capturats amb el mètode de portaobjectes segons l'anàlisi de la variància(ANOVA). Les dades corresponen a la quarta lectura.

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	0,1108	0,01847	0,293	0,936
Blocs	2	0,1107	0,05537	0,88	0,424
Total	33	2,077	0,06294		

L'efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats no va ser significativament diferent en la quarta lectura (taula 5).

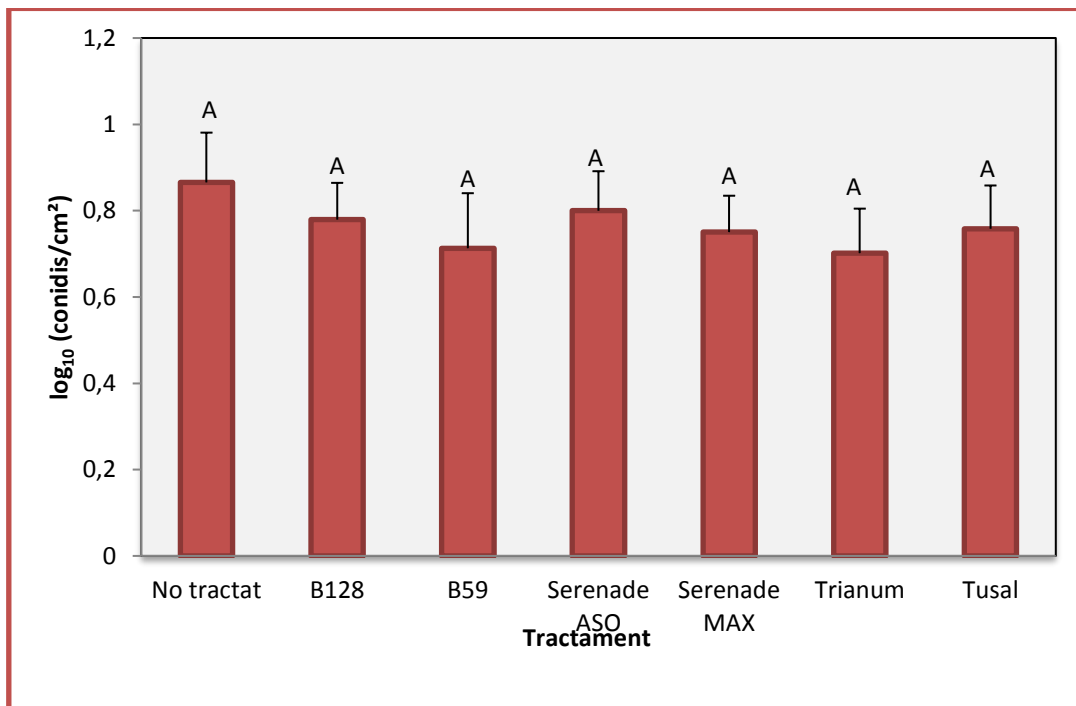


Figura 23: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de portaobjectes. Les dades corresponen a la quarta lectura. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$).

En la figura 23, s'observa que el control no mostra diferències significatives sobre cap dels tractaments.

4.1.6. Cinquena lectura (18/06/2018)

Taula 6 : Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis ($\log_{10}(\text{conidis})$) capturats amb el mètode de portaobjectes segons l'anàlisi de la variància(ANOVA). Les dades corresponen a la cinquena lectura.

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	0,5049	0,08416	2,621	0,0344
Blocs	2	0,0643	0,03215	1,001	0,3783
Total	33	1,0596	0,03211		

Pel que fa a l'inòcul determinat en la cinquena lectura, es va observar que hi havia diferències significatives entre tractaments (taula 6). El nombre de conidis capturats en el control no tractat va diferir dels capturats en el tractament Serenade MAX però no en la resta de tractaments (figura 24).

L'inòcul capturat en Serenade MAX no difereix del capturat de la resta de tractaments amb agents de biocontrol.

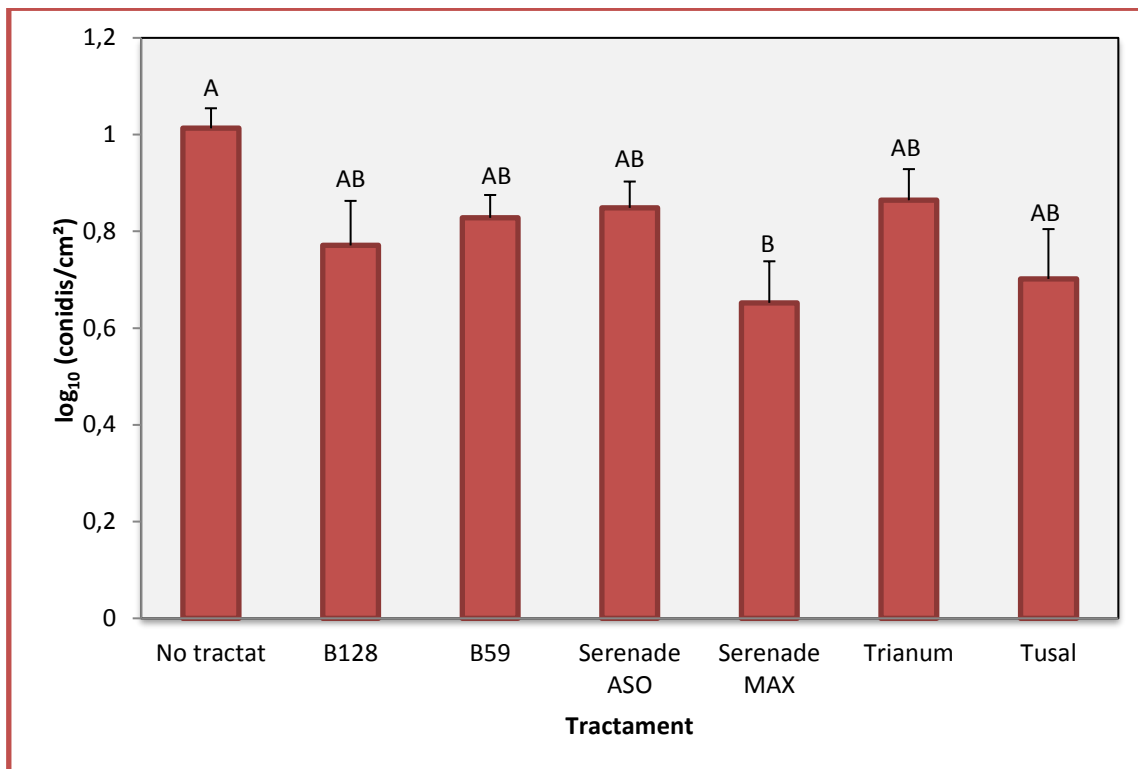


Figura 24: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de portaobjectes. Les dades corresponen a la cinquena lectura. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$).

4.2. Mesura de l'inòcul utilitzant capturadors dinàmics

Durant el període de l'assaig hi va haver un nombre elevat de precipitacions.

Es presentaran primerament els resultats globals obtinguts del total de captures i després desglossat per lectures.

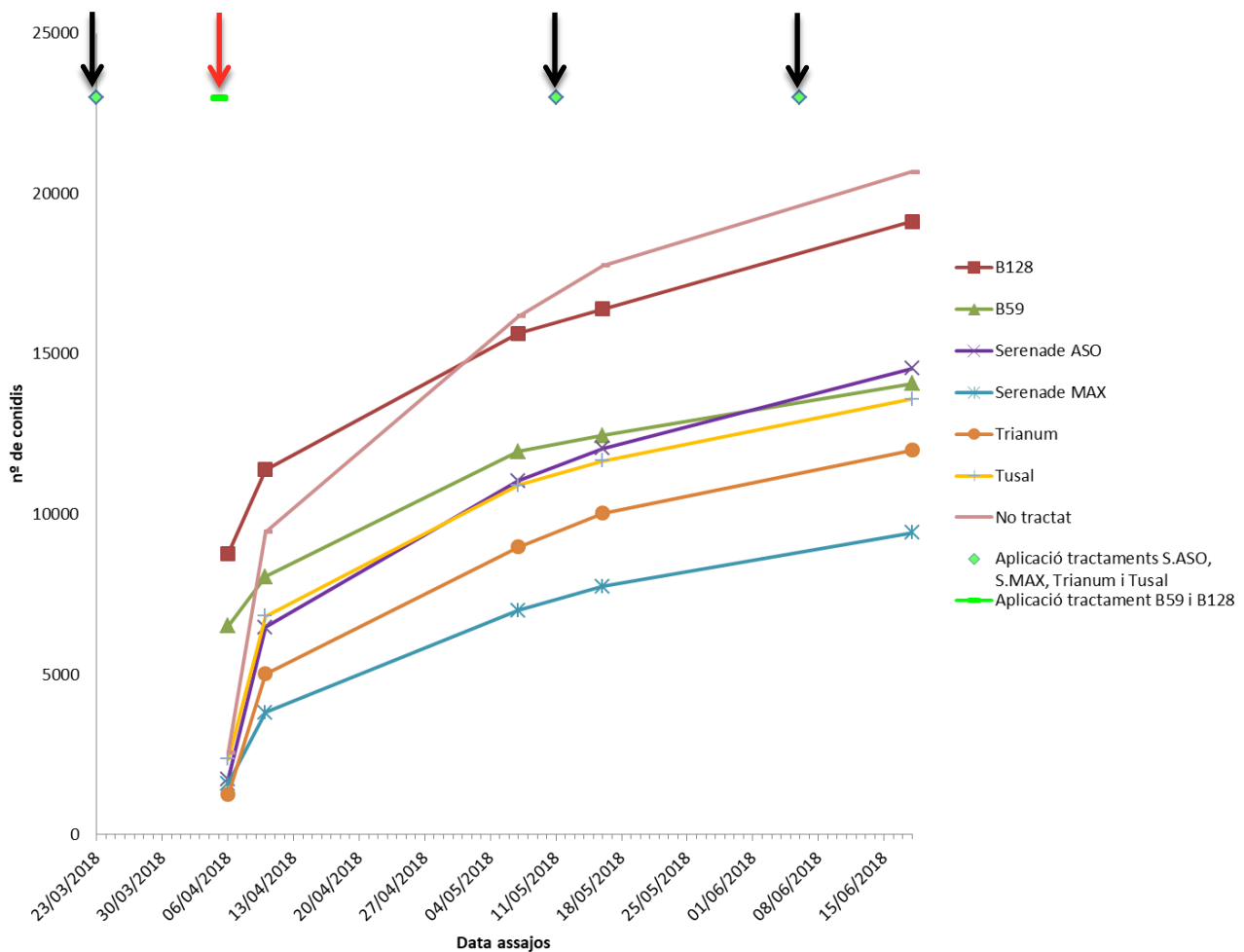


Figura 25: Dinàmica de les concentracions de conidis d'*Stemphylium vesicarium* acumulats en les 5 lectures realitzades per tractament amb el mètode de captospores pluviomètric.

En la figura 25, es mostra l'efecte dels agents de biocontrol en la producció d'inòcul expressats en nombre de conidis capturats al llarg del temps, en la primera lectura feta el 6 d'abril del 2018, el nombre de conidis en el cas del control augmenta considerablement respecte els tractaments, a partir de la tercera lectura (07/05/2018) s'observa en quin dels tractaments s'han capturat menys conidis respecte el control no tractat com és el cas del Serenade MAX i el Trianum, també hi ha un grup intermedi que s'ha mantingut constant durant l'assaig (Serenade ASO, Tusal, B59), i el que ha mostrat menys diferències respecte el control no tractat ha estat el B128.

4.2.1. Dades globals del mètode captoespores pluviomètric

Taula 7 : Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis d'*Stemphylium vesicarium* capturats amb el mètode de captoespores pluviomètric segons l'anàlisi de la variància (ANOVA). Les dades corresponen a la suma de les cinc lectures.

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	276411560	46068593	4,708	0,0109
Blocs	2	3789011	1894506	0,194	0,8265
Total	12	117427760	9785647		

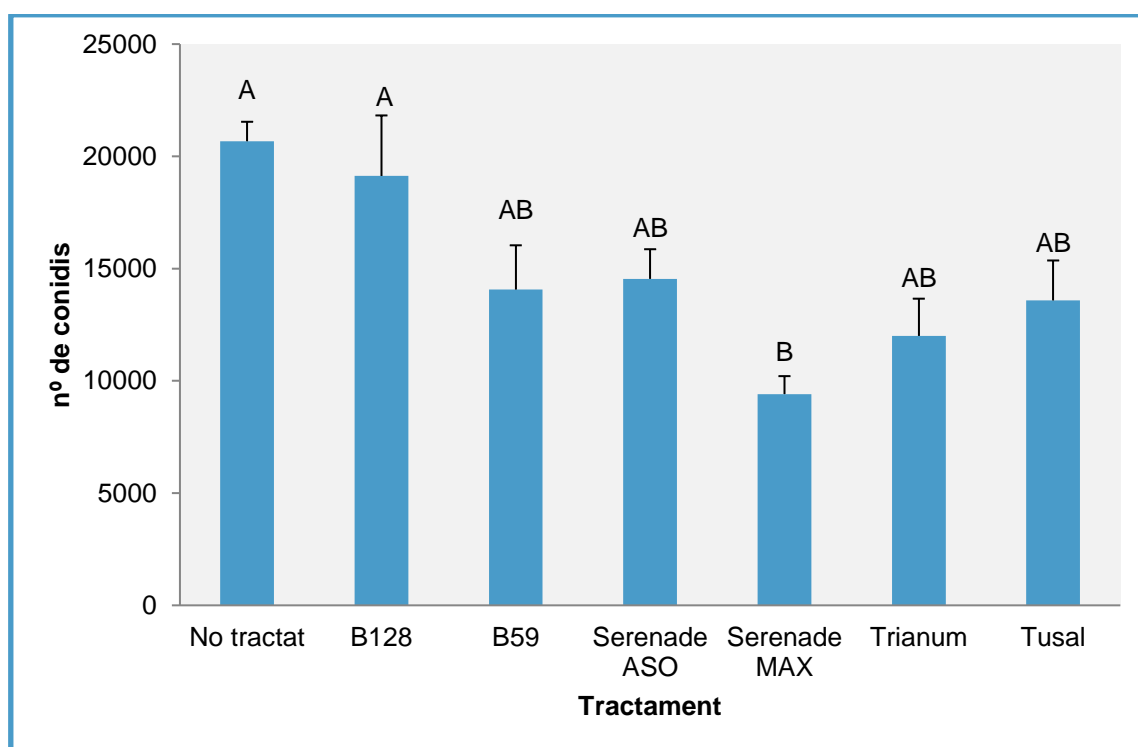


Figura 26: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de captoespores pluviomètric. Les dades corresponen al total de conidis capturats en les cinc lectures. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$).

Analitzant les dades globalment, l'efecte dels blocs no va ser significatiu, però sí que ho era l'efecte dels tractaments (taula 7). El nombre de conidis d'*S.vesicarium* capturats en el tractament Serenade MAX va ser significativament inferior al capturat en el control no tractat (figura 26), la resta de tractaments no va diferir ni del control no tractat ni del Serenade MAX.

A continuació es presenten els resultats analitzats per cada data de lectura.

4.2.2. Primera lectura (06/04/2018)

Taula 8 : Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis ($\log_{10}(\text{conidis})$) capturats amb el mètode de captospores pluviomètric segons l'anàlisi de la variància(ANOVA). Les dades corresponen a la primera lectura .

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	1,7672	0,29454	8,445	0,000965
Blocs	2	0,1792	0,08959	2,569	0,117879
Total	12	0,4186	0,03488		

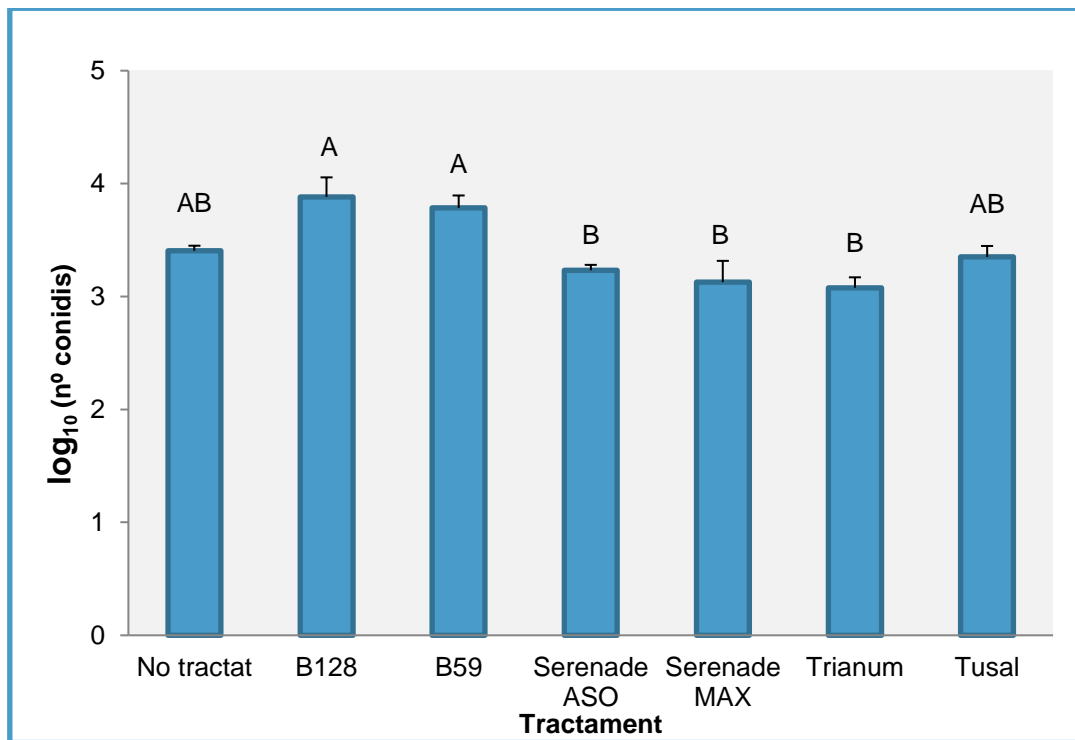


Figura 27: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de captoespores pluviomètric. Les dades corresponen a la primera lectura. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$).

Es pot observar (taula 8) com l'efecte dels tractaments és significatiu en la captura d'*S.vesicarium*, però el control no tractat no mostra diferències significatives amb la resta de tractaments (figura 27).

4.2.3. Segona lectura (10/04/2018)

Taula 9 : Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis ($\log_{10}(\text{conidis})$) capturats amb el mètode de captoespores pluviomètric segons l'anàlisi de la variància(ANOVA). Les dades corresponen a la segona lectura .

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	0,8489	0,14149	8,56	0,000908
Blocs	2	0,0422	0,02109	1,276	0,314428
Total	12	0,1984	0,01653		

En la segona lectura (taula 9) es van observar diferències significatives entre tractaments, sent el control no tractat a on es van capturar més conidis que en els tractaments B128, B59 i Serenade MAX. (figura 28).

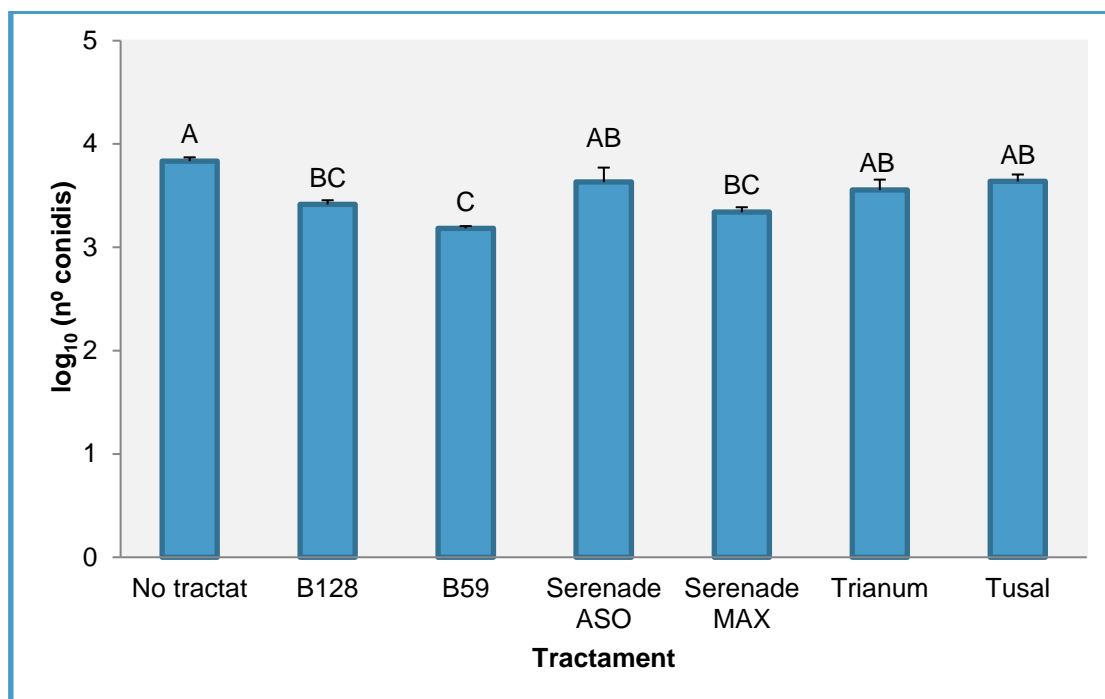


Figura 28: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de captoespores pluviomètric. Les dades corresponen a la segona lectura. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$).

4.2.4. Tercera lectura (07/05/2018)

Taula 10 : Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis capturats amb el mètode de captoespores pluviomètric segons l'anàlisi de la variància(ANOVA). Les dades corresponen a la tercera lectura.

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	22496224	3749371	2,692	0,0681
Blocs	2	3209672	1604836	1,152	0,3485
Total	12	16712825	1392735		

A la tercera lectura no es van observar diferències significatives entre tractaments (taula 10), tot i això en la prova de separació de mitjanes de Tukey, que analitza tots els tractaments per parelles, es va determinar que el nombre de conidis capturats en el control no tractat van ser significativament més elevats que el capturat en el Serenade MAX (figura 29).

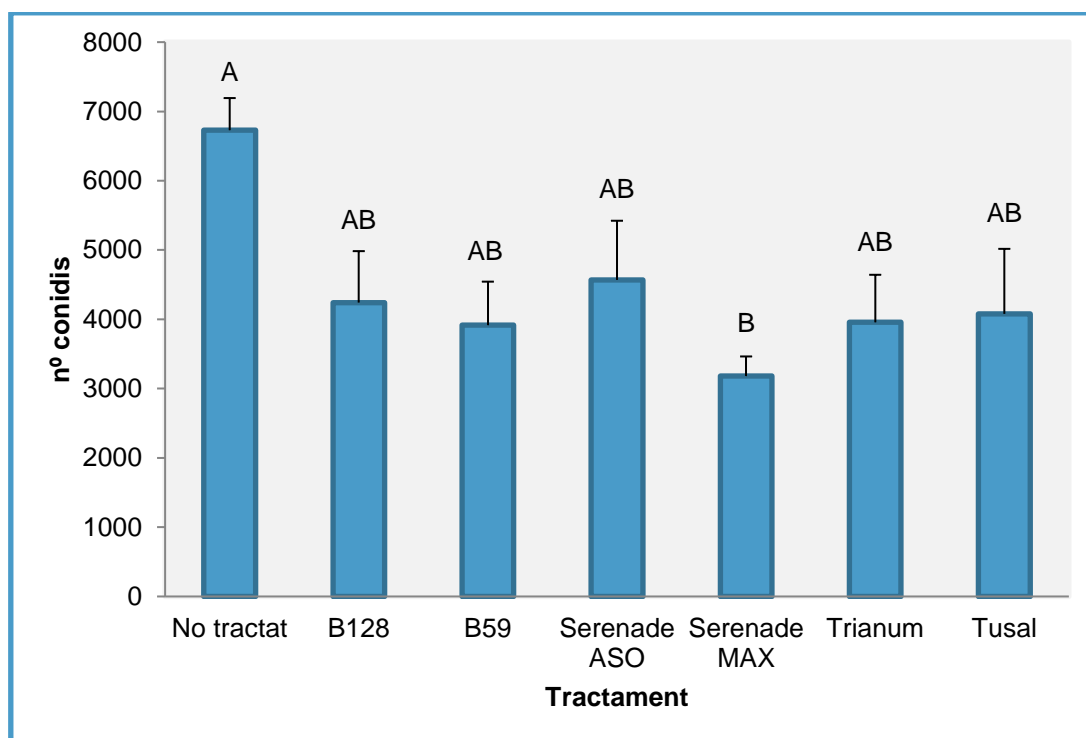


Figura 29: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de captospores pluviomètric. Les dades corresponen a la tercera lectura. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$).

4.2.5. Quarta lectura (16/05/2018)

Taula 11: Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis capturats amb el mètode de captoespores pluviomètric segons l'anàlisi de la variància(ANOVA). Les dades corresponen a la quarta lectura.

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	2150642	358440	30,9	0,00000127
Blocs	2	271219	135609	11,69	0,00152
Total	12	139192	11599		

En la quarta lectura (taula 11) es van observar que hi havien diferències significatives entre tractaments, sent el control no tractat a on es van capturar més conidis que en la resta de tractaments (figura 30).

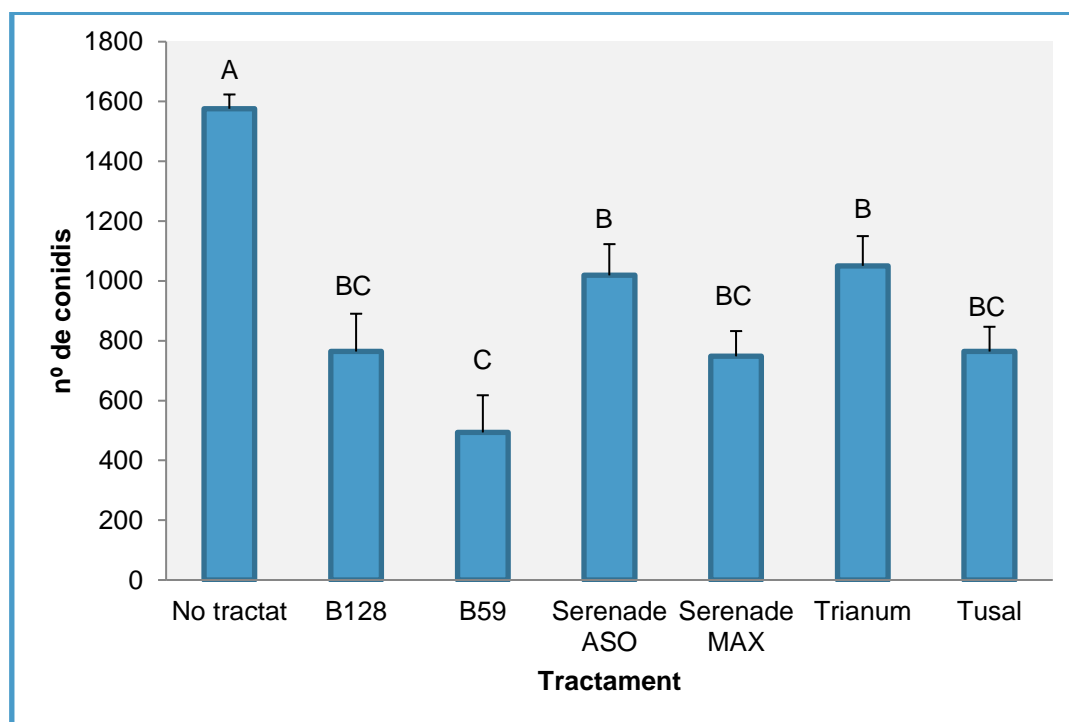


Figura 30: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de captoespores pluviomètric. Les dades corresponen a la quarta lectura. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$).

4.2.6. Cinquena lectura (18/06/2018)

Taula 12 : Efecte dels diferents tractaments sobre la quantitat de conidis capturats amb el mètode de captoespores pluviomètric segons l'anàlisi de la variància(ANOVA). Les dades corresponen a la cinquena lectura.

	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana de quadrats	F	P>F
Tractament	6	4906686	817781	8,209	0,0011
Blocs	2	176718	88359	0,887	0,4373
Total	12	1195500	99625		

A la cinquena lectura (taula 12) es va determinar que no hi havia diferències significatives entre els blocs, però sí que era significatiu l'efecte dels tractaments, sent el control no tractat a on es van capturar més conidis que en els tractaments B59, Serenade MAX, Trianum i Tusal (figura 31).

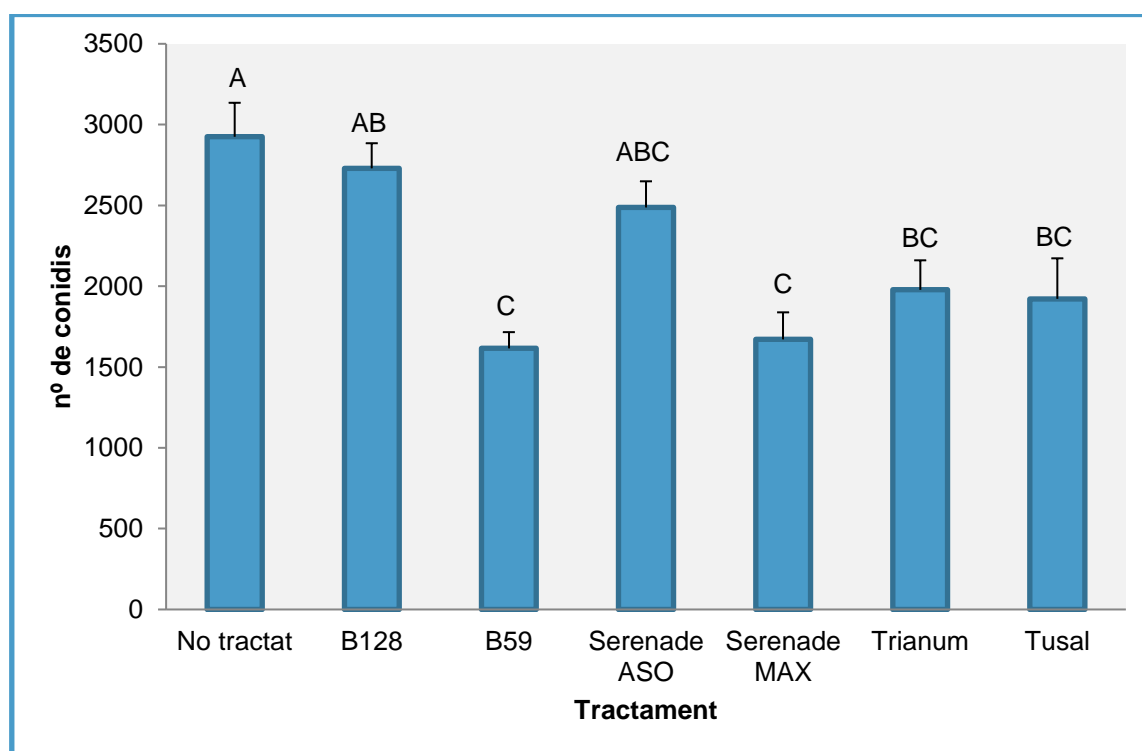


Figura 31: Efecte dels tractaments en el nombre de conidis capturats amb el mètode de captoespores pluviomètric. Les dades corresponen a la cinquena lectura. Les barres representen les mitjanes dels valors observats. Els intervals representants a la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferent segons la prova de Tukey ($P < 0.05$)

5. DISCUSSIÓ

En els últims anys s'han avaluat diversos agents de biocontrol, utilitzant diferents mètodes de captura. Com per exemple, el captador Burkard, Aylor, Trapman, Rotorods, Creté i el mètode portaobjectes utilitzat també en aquest treball del qual va mostrar una elevada eficàcia en l'extracció d'ascòspores de fulles colonitzades per *P. allii* i *S. vesicarium* (Rama,2013).

En el present treball, s'han avaluat diferents agents de biocontrol comparant dos mètodes de captura, el mètode de captura de tipus portaobjectes i el mètode pluviomètric.

Pel que fa al mètode de portaobjectes, ha funcionat correctament. El muntatge de les caixes amb les fulles inoculades a camp és bastant pràctic i senzill, la col·locació dels dos portaobjectes per caixa i per cada tractament portava més temps i dedicació, calia recollir aquests portaobjectes un cop a la setmana perquè quedava tota la superfície plena d'espores, pol·len, i pols i alhora de l'observació de conidis al microscopi hi havia algunes mostres que no es podien veure amb claredat. Posteriorment es fixaven les mostres i l'observació d'aquest al microscopi comportava un temps mitjà d'uns 15 minuts observant un transecte per mostra.

En canvi en el mètode de captoespores pluviomètric el seu muntatge és més complex. La recollida de les mostres depenia molt de les condicions climàtiques, és a dir de les precipitacions diàries. Les precipitacions durant aquest projecte han sigut bastant abundants i freqüents. Aquest mètode és més complex, ja que una vegada recollides les mostres s'havia de passar per un procés de filtratge i això comportava un temps aproximat de 6 minuts per mostra. Una vegada obtinguda la mostra es podien veure molt més bé els conidis en el microscopi amb un temps de 10 minuts per mostra observant 4 transectes en total.

Cal comentar que en el mètode de captoespores pluviomètric es van capturar més conidis d'*S.vesicarium* que en el mètode estàtic (portaobjectes). Tot i que el mètode de captoespores pluviomètric capturava més conidis, aquest mètode era menys fiable que els portaobjectes, ja que els portaobjectes capturaven l'emissió aèria de l'inòcul. Els conidis d'*S. vesicarium* es produeixen en la matèria orgànica en contacte directament amb el sòl i la seva alliberació era interceptada per aquests portaobjectes i per tant actuaven més com a simulació de la realitat. No obstant per

l'avaluació de les aplicacions dels agents de biocontrol en la producció d'inòcul, els dos mètodes són vàlids, amb l'avantatge que té el mètode pluviomètric de ser més fàcil i més abundant la captura de conidis i més clara la seva lectura amb microscòpia.

Els paràmetres ambientals com la temperatura, la humitat relativa i la humectació són paràmetres importants en la producció de conidis. La dinàmica d'aquests paràmetres climàtics varia durant l'assaig (figura 18) i poden condicionar els resultats obtinguts en l'avaluació de l'eficàcia dels agents de biocontrol.

Dels resultats obtinguts en les diferents dates de lectures, pels dos mètodes de mostreig, el Serenade MAX va ser el tractament que va mostrar una major eficàcia de control. Aquesta eficàcia va ser significativa en totes les lectures fetes amb el mètode dinàmic (pluviomètric) i a partir de la tercera lectura en el mètode estàtic. Al final de l'assaig el Serenade MAX juntament amb el Tusal i el Trianum van ser els que van acabar mostrant un menor número de conidis capturats.

L'agent de biocontrol Serenade MAX, formulat amb la matèria activa *Bacillus subtilis*, va resultar l'agent de biocontrol més eficaç. Està descrit que el mecanisme d'acció d'aquest producte està basat en la producció de perforacions en les membranes cel·lulars dels fongs patògens, causant el seu ràpid trencament, destrucció cel·lular i mort dels mateixos. En el cas de plantes indueix la seva resistència activant mecanismes interns que li confereixen una defensa natural a les plantes contra les malalties causades per fongs i bacteris (Bayer,2018).

Pel que fa al producte Tusal, format a partir de *Trichoderma asperellum* i *Trichoderma atroviride*, actua mitjançant microparasitisme directe contra diverses espècies de fongs fitopatògens del sòl. La barreja d'espècies garanteix l'eficàcia del producte, ja que si una espècie no és activa en unes condicions determinades, l'altra sí (Certis,2018).

El Trianum compost per *Trichoderma harzianum* el que fa és incrementar la resistència de la planta enfront l'estrès causat per malalties, fertilització, reg i condicions climàtiques sub-òptimes i també incrementa l'absorció de nutrients. Això pot fer augmentar el creixement de les arrels i de les parts superiors de la planta (Koppert,2018). En el cas de la producció d'inòcul el mecanisme

d'acció ha de ser una acció directa contra *S.vesicarium* ja sigui per microparasitisme o per competència.

Les dues soques experimentals B128 i B59 de l'INTEA han mostrat una eficàcia diferent. La soca B128 des del primer moment es va observar, en els dos mètodes de captura, que no hi havia diferències significatives comparant amb el control. La soca B59 al principi es mostrava ineficaç, però a mesura que passaven els dies, aquesta eficàcia augmentava. Cal remarcar que només es va aplicar aquest agent de biocontrol una vegada, indicant que la població es devia mantenir viable durant tot l'assaig.

Pel que fa al Serenade ASO formulat per *Bacillus subtilis*, prevé el creixement d'agents patògens en competir amb ells pel seu espai vital i pels nutrients sobre la superfície de la planta. El bacteri sintetitza substàncies que actuen sobre la permeabilitat de la membrana cel·lular (Bayer,2016), aquest producte no va resultar eficaç en aquest assaig, potser aquest producte seria més convenient aplicar-ho en una situació preventiva per evitar el creixement dels agents patògens.

6. CONCLUSIONS

1. El mètode estàtic de mostreig d'inòcul d'*Stemphylium vesicarium* basat en portaobjectes col·locats a camp és un mètode fàcil d'utilitzar i molt pràctic. És important la freqüència de canvi d'aquests portaobjectes per tal d'obtenir una bona imatge en el microscopi i millorar l'eficàcia del recompte de conidis d'*S. vesicarium*. Aquest mètode és que el simula més bé les condicions naturals d'emissió de conidis d'aquest fong.
2. El mètode dinàmic de mostreig d'inòcul d'*S.vesicarium* basat en el rentat per la pluja (mètode pluviomètric) ha funcionat eficaçment, el nombre de captures de conidis ha estat molt gran. És un mètode amb una metodologia més complexa i que depèn de la pluviometria, però la visualització de les imatges sota microscòpia òptica es neta i clara i fa que l'eficàcia i fiabilitat del recompte de conidis d'*S. vesicarium* sigui més alta que en el mètode estàtic. Tot i això, aquest mètode no simula massa bé les condicions naturals d'emissió del fong però es una eina molt vàlida per avaluar l'eficàcia dels agents de biocontrol en la producció d'inòcul.
3. L'agent de biocontrol Serenade MAX, que té com a matèria activa *Bacillus subtilis*, ha estat l'agent de biocontrol que en els dos mètodes de mostreig ha aconseguit disminuir significativament la producció d'inòcul d'*S. vesicarium*, respecte a l'obtinguda en els controls no tractats.
4. Els agents de biocontrol basats en *Trichoderma asperellum* i *T.atroviride* (Tusal) i *T. harzianum* (Triatum) han presentat una eficàcia molt alta (i semblant a la de Serenade Max) en la disminució de l'inòcul aeri d'*S. vesicarium* però menor quan s'ha mesurat l'inòcul rentat per la pluja.
5. La resta d'agents de biocontrol avaluats (B128, B59 i Serenade ASO) han mostrat una eficàcia més baixa del control d'inòcul d'*S. vesicarium* i que variava en funció del mètode de mostreig de l'inòcul.

7. BIBLIOGRAFIA

- **Ariza, Y., Sánchez, L.** 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp* .Publicación Científica Biomédicas. 10, 135-141.
- **Batllo, J.L.** 1984. Taca negrosa de la perera. Butlletí de la Cambra Agrària de Girona núm.25.
- **Bayer.** Data de consulta: 14 d'agost del 2018. Serenade MAX Recuperat de: https://www.cropscience.bayer.es/~media/Bayer%20CropScience/Country-Spain-Internet/labels/Serenade%20Max_Frutales.ashx?force=1
- **Bayer.** 2016. Ficha de datos de seguridad Serenade ASO. Recuperat de: https://www.cropscience.bayer.es/~media/Bayer%20CropScience/Country-Spain-Internet/msds/HS_Serenade%20ASO.ashx?force=1
- **Blancard, D., Allard, E., and Brest, P.** 1989. La stemphyliose du porrier ou “macules brunes”. Phytoma. 406, 37-38.
- **Cavanni, P., and Ponti, I.** 1994. Maculatura bruna del pero: una micopatia sempre d'attualità. Riv di Fruticult 12:37-42.
- **Certis.** 2018. Ficha técnica Tusal. Recuperat de: https://www.certiseurope.es/uploads/media/Ficha_tecnica_y_uso_seguro_Tusal_01.pdf
- **DeBach, P.** 1964. Biological Control of Insects Pests and Weeds. Chapman and Hall, London.
- **Harman, G. E.** 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma spp.* Phytopathology 96,190-194.

- **Chen, H., Wang, L., Su C.X., Gong, G.H., Wang, P., and Z.L. Yu, Z.L.** 2008. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254.
- **Koppert.** Data de consulta: 14 d'agost del 2018. TRIANUM-P. Recuperat de: <https://www.koppert.es/productos/productos-contra-plagas-enfermedades/trianum-p/>
- **Llorente, I., Montesinos, E.,** 2006. Brown spot of pear: an emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease* 90, 1368–1375.
- **Llorente, I., Moragrega C., Ruz, L., Montesinos, E.,** 2010a. Basis for new strategies in integrated control of brown spot of pear (*Stemphylium vesicarium*, teleomorph *Pleospora allii*). In: IOBC/WPRS Bulletin 54, 35–39.
- **Llorente, I., Moragrega, C., Ruz, L. and Montesinos, E.,** 2012 An update on control of brown spot of pear. *Trees* 26, 239–245.
- **Llorente, I., Vilardell, A., Vilardell, P., Patteri, E., Bugiani, R., Vittorio, R., Montesinos, E.** 2010b. Control of brown spot of pear by reducing the overwintering inoculum through sanitation. *European Journal of Plant Pathology* 128, 127–141.
- **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.
- **Pérez, N.** 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural-CEDAR. Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, Cuba 296 p.
- **R Core Team.** 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Recuperat de: <https://www.R-project.org/>.

- **Rama, S.** 2013 Desenvolupament d'un mètode de quantificació d'inòculde l'estemfiliosi de la perera per avaluar l'eficàcia de dos agents de biocontrol. Treball Final de Carrera, Girona, Universitat de Girona.
- **Rossi, V., Patteri, E.** 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.
- **Rossi, V., Patteri, E., Bugiani, R.** 2008. Sources and seasonal dynamics of inoculum for brown spot disease of pear. *European Journal of Plant Pathology* 121, 147–159.
- **Rossi, V., Patteri, E., Giosue, 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.
- **Subirats, J.** 2012 Avaluació de les soques B128, B28 i B59 de *Bacillus subtilis* com agents de biocontrol d'*Stemphylium vesicarium* en perera. Treball Final de Màster, Girona, Universitat de Girona.
- **Vilardell, P.** 1988. *Stemphylium vesicarium* en plantaciones de peral. *Fruticultura Profesional* 18, 51-55.