



Universitat de Girona

# INTERACCIÓ PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. SYRINGAE-PERERA: FACTORS DETERMINANTS I ACTIVITAT DE DIVERSOS FOSFONATS EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA MALALTIA

**Concepció MORAGREGA I GARCIA**

**Dipòsit legal: Gi. 1807-2012**

<http://hdl.handle.net/10803/96472>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL

**INTERACCIÓ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*-PERERA.  
FACTORS DETERMINANTS I ACTIVITAT DE  
DIVERSOS FOSFONATS EN EL DESENVOLUPAMENT  
DE LA MALALTIA**

CONCEPCIÓ MORAGREGA i GARCIA

Setembre, 1997



# Universitat de Girona

Departament d'Enginyeria Química, Agrària i  
Tecnologia Agroalimentària

Institut de Tecnologia Agroalimentària

## **INTERACCIÓ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*-PERERA. FACTORS DETERMINANTS I ACTIVITAT DE DIVERSOS FOSFONATS EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA MALALTIA**

Memòria redactada per optar al Grau de Doctor en  
Biologia, per la Universitat de Girona, per

**Concepció Moragrega i Garcia**

Vist-i-plau  
El Director de la Tesi

**Dr. Emili Montesinos**  
Catedràtic de Producció Vegetal

Girona, setembre de 1997

## AGRAÏMENTS

---

Són moltes les persones sense les quals aquest treball no s'hauria realitzat. En primer lloc vull agrair al Dr. Emili Montesinos la direcció del treball i el seu interès i dedicació, tant en la part experimental com en els tractaments estadístics i la redacció de la memòria.

A l'Estació Experimental Agrícola de la Fundació Mas Badia per facilitar el material vegetal de la Col·lecció de Varietats de Perera i la realització dels tractaments en les seves plantacions. En especial vull agrair a Pere Vilardell, Tècnic de l'Associació de Defensa Vegetal de Productors de Pera, l'ajut en els treballs de camp (recollida de mostres i tractaments amb fosfonats), així com l'assessorament en aspectes agronòmics del treball. Agraeixo també, a Joaquim Carbó la informació sobre les varietats de perera de la Col·lecció.

A la Dra. Milagros López de l'IVIA per haver cedit algunes de les soques de bacteris fitopatògens utilitzades en aquest treball.

A l'Station de Pathologie Végétale et Phytobactériologie del Centre de Recherches d'Angers de l'INRA, on s'ha realitzat part del treball experimental que es presenta. Al seu director Dr. J.P. Paulin pels seus consells i aclariments i per haver cedit part de les soques de *P. syringae* utilitzades en aquest treball, al Dr. J. Luisetti per haver permès treballar en el seu laboratori, i en especial al Dr. C. Manceau per la seva col·laboració en diversos aspectes d'aquest treball. També vull agrair a M.N. Brisset els consells en aspectes tècnics de la mesura de la pèrdua d'electròlits de discs foliars i molt especialment a M. Devaux per la col·laboració en el treball de laboratori.

A Isidre Llorente vull agrair-li el temps dedicat sobretot a la discussió d'aspectes de Fitopatologia i d'Estadística, que amb el seu punt de vista crític m'ha ajudat a aprofundir o aclarir determinats punts del treball. També vull agrair-li la col·laboració puntual en el treball de camp (recollida de mostres), de laboratori (inoculacions) i la realització de fotografies.

Agraeixo a Josep Pereda la preparació i manteniment del material vegetal utilitzat al llarg d'aquest treball, i al Dr. Florencio de la Torre per deixar-nos la microbureta automàtica per a realitzar les inoculacions i el programa informàtic pel seu funcionament. A Concepció Bacardit i Esther Badosa per haver col·laborat en la realització d'alguns dels experiments, i a Josep Lluís Juan per haver realitzat algunes determinacions analítiques (fosfats).

A Carme Carulla i Jordi Blavia del Servei de Microscòpia de la Universitat de Girona per la preparació de les mostres i l'assessorament en les observacions, així com la realització dels positivat de les micrografies. A Almudena Garcia del Servei Científico-Tècnic de la Universitat de Barcelona per la realització dels talls ultrafins amb l'ultramicrotòtom.

Finalment agrair al Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària de l'Escola Politècnica Superior de la Universitat de Girona i als seus membres, en especial als companys i companyes de laboratori per haver compartit espai, material i temps. A Carmen Dilme, secretària de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària la realització dels tràmits administratius.

El treball que ha portat a la realització d'aquesta Tesi Doctoral s'ha realitzat dins els projectes del *Plan Nacional I+D* (CICYT AGF92-0833 i AGF95-0313) i de la *Subdirección General de Cooperación Internacional M.E.C. Acciones Integradas Hispano-Francesas* (HF-208) i *Acciones Integradas Hispano-Italianas* (AGR-95A). També s'ha rebut finançament de la Universitat de Girona a través d'Ajuts PIAR per a la realització de tesis doctorals durant els anys 1993 i 1995.

## SIGLES I ABREVIATURES UTILITZADES

<b>b</b>	Constant de variació en el temps de la taxa de sortida d'electròlits <i>Time variation constant for electrolyte leakage relative rate</i>
<b>C<sub>i</sub></b>	Conductivitat en el temps $t=i$ <i>Conductivity at time <math>t=i</math></i>
<b>C<sub>max</sub></b>	Conductivitat màxima <i>Maximum conductivity</i>
<b>CMI (MIC)</b>	Concentració mínima inhibidòria <i>Minimal inhibitory concentration</i>
<b>CYE</b>	Casitona-extracte de llevat <i>Casitone-yeast extract</i>
<b>DE<sub>50</sub> (ED<sub>50</sub>)</b>	Dosi efectiva mediana <i>Median effective dose</i>
<b>DE<sub>90</sub> (ED<sub>90</sub>)</b>	Dosi efectiva 90% <i>90% effective dose</i>
<b>DL<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub>)</b>	Dosi letal mitjana <i>Median letal dose</i>
<b>HR</b>	Reacció hipersensible <i>Hypersensitive reaction</i>
<b>i. a.</b>	Ingredient actiu <i>Active ingredient</i>
<b>INA</b>	Actiu en la nucleació de gel <i>Ice nucleation active</i>
<b>I<sub>s</sub></b>	Índex de severitat <i>Severity index</i>
<b>I<sub>s<sub>r</sub></sub></b>	Índex relatiu de severitat <i>Relative Severity index</i>
<b>I<sub>v<sub>r</sub></sub></b>	Índex relatiu de virulència <i>Relative Virulence index</i>
<b>K</b>	Taxa relativa de sortida d'electròlits <i>Relative rate of electrolyte leakage</i>

<b><math>K_0</math></b>	Taxa inicial de sortida d'electròlits <i>Initial rate of electrolyte leakage</i>
<b>p.v.</b>	patovar <i>patovar</i>
<b>Sf</b>	Severitat de la infecció per fulla <i>Leaf infection severity</i>
<b>Sp</b>	Severitat de la malaltia per planta <i>Plant disease severity</i>
<b>SAR</b>	Resistència sistèmica adquirida <i>Systemic acquired resistance</i>
<b>t</b>	Temps <i>Time</i>
<b><math>t_{50}</math></b>	Temps de pèrdua mediana d'electròlits <i>Median electrolyte leakage time</i>
<b>ufc (cfu)</b>	Unitat formadora de colònies <i>Colony formation unit</i>
<b>YDC</b>	Extracte de llevat-dextrosa-carbonat càlcic <i>Yeast extract-dextrose-calcium carbonate</i>

## RESUM

---

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* és un bacteri que ha estat descrit com agent causant de diverses malalties en més de 200 espècies vegetals. En perera causa la necrosi bacteriana, que afecta la majoria de zones productores de pera del món, provocant un debilitament dels arbres i una disminució de la productivitat. Aquesta malaltia es manifesta amb diferent simptomatologia en funció del teixit i l'estat vegetatiu de l'hoste. En escorça sol manifestar-se a finals de tardor i durant l'hivern formant xancre. A la primavera produeix necrosis localitzades en flors, fruits immadurs i fulles. El control de la malaltia es basa en l'aplicació preventiva de derivats cúprics i antibiòtics (kasugamicina, estreptomícina). El control però, es veu limitat per la baixa eficàcia d'aquests productes, els problemes de fitotoxicitat en la planta i l'aparició de resistències en el patogen. De fet, la moderada eficàcia dels productes químics convencionals en el control de la malaltia, juntament amb la problemàtica de la utilització d'aquests compostos (toxicitat, residus) fa que es tendeixi a sistemes de control preventiu integrats que incloguin pràctiques culturals, utilització de varietats resistents, juntament amb un control químic racional. En els darrers anys, el fosetil-Al, un derivat de l'àcid fosfònic utilitzat com a fungicida sistèmic en el control de malalties causades per oomicets en espècies vegetals, s'ha mostrat eficaç o moderadament eficaç en el control de determinades malalties bacterianes en plantes i de la necrosi de borrons de flor de la perera. La forma d'actuació d'aquest producte no es coneix, tot i que en el control de malalties fúngiques podria actuar estimulants mecanismes de defensa en la planta.

Per a la utilització del fosetil-Al i altres derivats de l'àcid fosfònic en el control químic de la necrosi bacteriana de la perera cal conèixer la forma d'actuació dels productes sobre el patogen, en la planta i en la interacció bacteri-planta. En el treball que es presenta s'ha determinat l'activitat de diversos fosfonats (fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina) en el control de la infecció per *P. syringae* pv. *syringae* en perera. Per a això s'han desenvolupat models d'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera i s'han determinat els factors que afecten la interacció. Aquests models de laboratori, en haver permès conèixer aspectes concrets de la interacció hoste-patogen i definir de forma



clara el tipus d'interacció, s'han aplicat a l'estudi de l'activitat dels fosfonats en la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera i en el control de la malaltia.

S'han determinat els factors que afecten la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera. La temperatura òptima pel desenvolupament de la malaltia, en condicions controlades, és de 20-25 °C, els teixits joves són més susceptibles que els adults i la dosi crítica per a la infecció i desenvolupament de símptomes és de  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>. La DE<sub>50</sub> és de  $5 \times 10^6$  ufc ml<sup>-1</sup> i la dosi òptima per observar de forma clara símptomes de la malaltia és d'entre  $10^7$  i  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>. S'ha avaluat la sensibilitat de 45 varietats europees de perera a *P. syringae* pv. *syringae* i la virulència de diversos aïllats del patogen. La majoria de les varietats d'interès comercial s'han mostrat sensibles al patogen. Entre les varietats poc sensibles hi ha varietats autòctones (MB-6, MB-7, i MB-14), i les varietats Maxine, Rogue Red i Winter Nellis. Totes les soques del patogen avaluades s'han mostrat patogèniques en perera, amb diferent grau de virulència. Les soques procedents de teixits infectats de perera han estat més virulentes que les procedents d'altres hostes o de teixits sans. La tècnica d'inoculació per microinfiltració localitzada de *P. syringae* en fulles en plantes micropropagades de perera, permet realitzar un seguiment de la malaltia en la planta sencera i conèixer aspectes de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera, relacionats amb la multiplicació bacteriana i els canvis produïts en els teixits foliars de les plantes durant la interacció, caracteritzant en cada cas les situacions compatible i incompatible. L'evolució de la població bacteriana i el desenvolupament de símptomes macroscòpics en fulles de plantes inoculades amb *P. syringae* depenen del tipus d'interacció i de la dosi inicial d'inòcul. En la interacció compatible la població bacteriana infiltrada en les fulles augmenta al llarg del temps, mentre que en la interacció incompatible es manté estable o disminueix. Els símptomes de la interacció compatible corresponen a necrosis hidratades que progressen per la superfície de la fulla des del punt d'infiltració del patogen. En la situació incompatible es formen necrosis bloquejades i seques, limitades al punt d'inoculació. L'observació al microscopi electrònic dels teixits foliars de plantes de perera infiltrades amb *P. syringae* ha posat de manifest la localització dels bacteris en l'espai intercel·lular del mesofil·le de les fulles i la interacció bacteri-planta en cada situació. En la interacció compatible s'estableix contacte físic directe entre les cèl·lules bacterianes i les cèl·lules parenquimàtiques del mesofil·le de les fulles, o bé per estructures granulars electrodenses que apareixen en la superfície externa de la paret cel·lular vegetal en zones amb bacteris propers. En la situació incompatible els bacteris queden bloquejats en l'espai intercel·lular formant agregats envoltats per material fibril·lar. Utilitzant una tècnica de mesura de la conductivitat de solucions amb discs foliars infiltrats amb bacteris fitopatògens i aplicant models matemàtics, s'ha definit la

cinètica de sortida d'electròlits de discs foliars de perera inoculats amb *P. syringae* en les situacions compatible i incompatible.

A partir d'aquests resultats s'han definit models d'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera basats en la utilització de plantes de perera amb brots en creixement actiu de la varietat Conference (sensible), soques del patogen virulentes (EPS94), dosis d'inòcul d'entre  $10^7$  i  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> i condicions d'incubació concretes (20-25 °C i 70-80% d'humitat relativa). Aquests models s'han aplicat al coneixement de l'activitat dels fosfonats.

L'aplicació de fosfonats per irrigació o polvorització provoca el desenvolupament de símptomes i canvis de permeabilitat i estructurals en els teixits foliars de perera, en inocular *P. syringae* pv. *syringae*, similars als de la interacció incompatible. El tractament de plantes de perera amb fosfonats redueix de forma significativa i consistent els nivells de malaltia i la virulència del patogen. L'efecte dels fosfonats en el control de la necrosi bacteriana de la perera està relacionat amb la forma d'aplicació, dosi, cadència i tipus de producte. La fosfomicina i l'etefon han estat els productes amb major efecte en la reducció de la malaltia, amb DE<sub>50</sub> de 0.50 i 1.47 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>, respectivament. El fosfonat potàssic i el fosetil-Al han mostrat una eficàcia moderada, amb DE<sub>50</sub> de 2.9 i 5.5 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>, respectivament. Seria necessari millorar l'eficàcia d'aquests dos productes determinant la forma i el moment d'aplicació idonis per afavorir la seva absorció i translocació en la planta fins a l'òrgan a protegir. Per altra banda, el fosetil-Al, el fosfonat potàssic i l'etefon han presentat baixa activitat antibacteriana *in vitro* amb CMI's de 0.32 a 0.63 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>. Els canvis observats en els teixits de plantes tractades amb fosfonats i inoculades amb el patogen i la baixa activitat *in vitro* d'aquests productes fa pensar en la possible actuació dels fosfonats en la planta estimulants mecanismes de defensa durant la interacció amb *P. syringae*.

## RESUMEN

---

*P. syringae* pv. *syringae* es una bacteria causante de diversas enfermedades en más de 200 especies vegetales. En peral causa la necrosis bacteriana, que afecta a la mayoría de zonas productoras de pera del mundo, provocando un debilitamiento de los árboles y una disminución de la productividad. Esta enfermedad se manifiesta con diferente sintomatología en función del tejido y del estado fenológico del huésped. En corteza suele manifestarse a finales de otoño y durante el invierno formando chancros. En primavera produce necrosis localizadas en flores, frutos inmaduros y hojas. El control de la enfermedad se basa en la aplicación preventiva de derivados cúpricos y antibióticos (kasugamicina, estreptomicina). No obstante, el control está limitado por la baja eficacia de estos productos, por problemas de fitotoxicidad en la planta y por la aparición de resistencias en el patógeno. De hecho, la eficacia moderada de los productos químicos convencionales en el control de la enfermedad, junto con la problemática de la utilización de estos compuestos (toxicidad, residuos) ha llevado a sistemas de control preventivo integrados que incluyen prácticas culturales, utilización de variedades resistentes, junto con un control químico racional. En los últimos años, el fosetil-Al, un derivado del ácido fosfónico, utilizado como fungicida sistémico en el control de enfermedades causadas por oomicetes en especies vegetales, se ha mostrado eficaz o moderadamente eficaz en el control de determinadas enfermedades bacterianas en plantas y de la necrosis de yemas de flor en peral. La forma de actuación de este producto no se conoce, a pesar de que en el control de enfermedades fúngicas podría actuar estimulando mecanismos de defensa en la planta.

Para la utilización del fosetil-Al y otros derivados del ácido fosfónico en el control químico de la necrosis bacteriana del peral es necesario conocer la forma de actuación de los productos en el patógeno, en la planta y en la interacción bacteria-planta. En el trabajo que se presenta se ha determinado la actividad de diversos fosfonatos (fosetil-Al, fosfonato potásico, etefón y fosfomicina) en el control de la infección por *P. syringae* pv. *syringae* en peral. Para ello se han desarrollado modelos de estudio de la interacción *P. syringae* pv. *syringae*-peral y se han determinado los factores que afectan a dicha interacción. Estos modelos de laboratorio, al haber sido útiles para conocer aspectos

concretos de la interacción huésped-patógeno y para definir de forma clara el tipo de interacción, han sido utilizados en el estudio de la actividad de los fosfonatos en la interacción *P. syringae* pv. *syringae*-peral y en el control de la enfermedad.

Se han determinado los factores que afectan a la infección de *P. syringae* pv. *syringae* en peral. La temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad, en condiciones controladas, es de 20-25 °C, los tejidos jóvenes son más susceptibles que los adultos y la dosis crítica para la infección y desarrollo de síntomas es de  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>. La DE<sub>50</sub> es de  $5 \times 10^6$  ufc ml<sup>-1</sup> y la dosis óptima para la observación de síntomas claros de la enfermedad se sitúa entre  $10^7$  y  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>. Se ha evaluado la sensibilidad a *P. syringae* pv. *syringae* de 45 variedades europeas de peral y la virulencia de diversos aislados del patógeno. La mayoría de las variedades de interés comercial se han mostrado sensibles al patógeno. Entre las variedades poco sensibles se encuentran las variedades autóctonas (MB-6, MB-7, y MB-14), y las variedades comerciales Maxine, Rogue Red y Winter Nellis. Todas las cepas del patógeno evaluadas se han mostrado patogénicas en peral, con distinto grado de virulencia. Las cepas procedentes de tejidos infectados de peral han sido más virulentas que las procedentes de otros huéspedes o de tejidos sanos. La técnica de inoculación por microinfiltración localizada de *P. syringae* en hojas en plantas micropropagadas de peral, permite realizar un seguimiento de la enfermedad en la planta y conocer aspectos de la interacción *P. syringae* pv. *syringae* -peral, relacionados con la multiplicación bacteriana y con los cambios producidos en los tejidos foliares durante la interacción, caracterizando en cada caso las situaciones compatible e incompatible. La evolución de la población bacteriana y el desarrollo de síntomas macroscópicos en hojas de plantas inoculadas con *P. syringae* están relacionados con el tipo de interacción y con la dosis inicial de inóculo. En la interacción compatible la población bacteriana infiltrada en las hojas aumenta a lo largo del tiempo, mientras que en la interacción incompatible se mantiene estable o disminuye. Los síntomas de la interacción compatible corresponden a necrosis hidratadas que progresan por la superficie de la hoja desde el punto de infiltración del inóculo. En la situación incompatible se forman necrosis bloqueadas y secas, limitadas al punto de inoculación. La observación al microscopio electrónico de los tejidos foliares de plantas de peral infiltradas con *P. syringae* ha puesto de manifiesto la localización de las bacterias en el espacio intercelular del mesófilo de las hojas y la interacción bacteria-planta en cada situación. En la interacción compatible se establece contacto físico directo entre las células bacterianas y las células parenquimáticas del mesófilo de las hojas, o mediante estructuras granulares electrodensas que aparecen en la superficie externa de la pared celular vegetal en zonas próximas a bacterias. En la situación incompatible las bacterias quedan bloqueadas en el espacio intercelular formando

agregados rodeados por material fibrilar. Utilizando una técnica de medida de la conductividad en soluciones con discos foliares infiltrados con bacterias fitopatógenas y aplicando modelos matemáticos al tratamiento de los datos cinéticos, se ha definido la cinética de salida de electrolitos de discos foliares de peral inoculados con *P. syringae* en las situaciones compatible e incompatible.

A partir de estos resultados se han definido modelos de estudio de la interacción *P. syringae* pv. *syringae* -peral basados en la utilización de plantas de peral con brotes en crecimiento activo, de la variedad Conference (sensible), cepas del patógeno virulentas (EPS94), dosis de inóculo entre  $10^7$  y  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> y condiciones de incubación definidas (20-25 °C y 70-80% de humedad relativa). Estos modelos se han utilizado para la determinación de la actividad de los fosfonatos.

La aplicación de fosfonatos por irrigación o pulverización provoca el desarrollo de síntomas así como cambios de permeabilidad y estructurales en los tejidos foliares de peral, al inocular *P. syringae* pv. *syringae*, similares a los observados en la interacción incompatible. El tratamiento de plantas de peral con fosfonatos reduce de forma significativa y consistente los niveles de enfermedad y la virulencia del patógeno. El efecto de los fosfonatos en el control de la necrosis bacteriana del peral está relacionado con la forma, dosis y cadencia de aplicación, y con el tipo de producto. La fosfomicina y etefón han sido los productos con mayor efecto en la reducción de la enfermedad, con DE<sub>50</sub> de 0.50 y 1.47 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>, respectivamente. El fosfonato potásico y fosetil-Al han presentado una eficacia moderada, con DE<sub>50</sub> de 2.9 y 5.5 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>, respectivamente. Sería necesario mejorar la eficacia de estos dos productos determinando la forma y el momento idóneos de aplicación para incrementar su absorción y translocación en la planta hasta el órgano a proteger. Por otra parte, el fosetil-Al, fosfonato potásico y etefón han presentado baja actividad antibacteriana *in vitro* con CMIs de 0.32 a 0.63 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>. Los cambios observados en los tejidos de plantas tratadas con fosfonatos e inoculadas con el patógeno, junto con la baja actividad *in vitro* de estos productos sugiere una posible actuación de los fosfonatos en la planta estimulando mecanismos de defensa durante la interacción con *P. syringae*.

## SUMMARY

---

Blast of pear caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is one of the bacterial diseases that limit pear production throughout the world. Symptoms are characterized by blast of buds and blossoms which causes significant loss of fruit production, and necrotic spots on leaves or fruits. Other common symptoms are papyraceous cankers on trunks and branches. Control of bacterial blast of pear with chemicals is difficult and is based on copper compounds and antibiotics. However, its use is limited by the low efficacy, phytotoxicity to the plant or emerging resistance of the pathogen. Integrated control including the use of cultural practices and of disease-resistant cultivars, as well as rational chemical control, could increase control efficacy and reduce environmental impact of pesticide residues. Fosethyl-Al, a phosphonate derivative used to control diseases caused by fungi members of the Oomycetes, has been evaluated for control of several bacterial diseases on plants and the bacterial blossom blast of pear, showing high or moderate efficacy. The mode of action of fosethyl-Al is still unknown, although in fungal disease control it could act inducing defence responses in plants. For using fosethyl-Al and other phosphonate derivatives in control of bacterial blast of pear, the activity of these compounds on the pathogen, within the plant and on plant-bacteria interaction must be evaluated.

The activity of several phosphonates (fosethyl-Al, potassium phosphonate, etephon and fosfomicin) for control of *P. syringae* pv. *syringae* infection on pear was determined. Laboratory models for studying *P. syringae* pv. *syringae*-pear interaction were developed.

Several factors affect pear infection by *P. syringae* pv. *syringae*. The optimal temperature for disease development, under controlled environmental conditions, is 20-25°C, young tissues are more susceptible than mature ones, the critical dose for infection and symptom development is  $10^6$  cfu ml<sup>-1</sup>, ED<sub>50</sub> is  $5 \times 10^6$  cfu ml<sup>-1</sup>, and the optimal dose for symptoms development is  $10^7$ - $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>. The susceptibility of 45 european pear cultivars to *P. syringae* pv. *syringae* and the virulence of several pathogen isolates were evaluated. Most of commercial pear cultivars are susceptible to *P. syringae* pv. *syringae*.

All pathogen isolates tested were pathogenic on pear. Variations among the strains of *P. syringae* pv. *syringae* were pointed out. All strains isolated from pear tissues with symptoms were more virulent than strains recovered from healthy tissues or from different host. Inoculation of *P. syringae* in whole pear plants by local infiltration of leaves was used to study bacterial growth, symptoms development and bacteria localization in the host tissues, in compatible and incompatible plant-bacteria interactions. In compatible reaction bacteria multiplied and colonized the intercellular space and spread into the uninoculated tissues, causing progressively enlarging necrotic, water soaked, lesions. In non-compatible interaction bacteria remained confined to the site of inoculation and leaf tissue appeared desiccated. Electron micrographs of plant tissues inoculated with *P. syringae* showed localization of bacteria in mesophyll intercellular spaces of pear plant leaves, in both compatible and incompatible interactions. In compatible reaction bacteria were in close contact with plant cell wall, and electron-opaque granular particles were associated with bacterial and plant cells. In non-compatible reaction bacterial cells were more densely packed and surrounded by a network of fibrillar material. A technique that allows the quantification of electrolyte leakage from plant tissues inoculated with pathogenic bacteria was used to define the electrolyte leakage patterns in compatible and incompatible *P. syringae*-pear interactions. A mathematical model was used to compare electrolyte leakage kinetics depending on the type of interactions.

Results obtained has been useful to define a laboratory model based on the use of micropropagated pear plants of susceptible cultivars (Conference), virulent strains of the pathogen (EPS94), inoculum dose ranging from  $10^7$  to  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>, and defined incubation conditions (temperature of 20-25 °C and relative humidity of 70-80%). This model was used to evaluate the effect of phosphonate derivatives on *P. syringae* pv. *syringae*-pear interaction and on control of bacterial blast of pear.

Plant treatment with phosphonates induced particular symptoms in leaves, structural modifications of plant cell tissues and changes in plant cell permeability, after inoculation with *P. syringae* pv. *syringae*, similar to the incompatible reaction. Drenching the root system of pear plants with either potassium phosphonate, fosethyl-Al, etephon or fosfomicin, decreased significantly and consistently disease levels after inoculation with *P. syringae* pv. *syringae*. The effect of phosphonates on the control of bacterial blast of pear is related to product, dose and number of applications. Fosfomicin and etephon were the most effective products in reducing disease levels, with median effective dose (ED<sub>50</sub>) of 0.5 and 1.47 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>, respectively. Potassium phosphonate and fosethyl-Al were moderately effective, with ED<sub>50</sub> of 2.9 and 5.5 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>, respectively. Although

the ED<sub>50</sub> of potassium phosphonate and fosethyl-Al applied by irrigation to pear plants may be too high for a practical use in the field, it is expected that improvement of plant absorption and application methods may increase the efficiency of these compounds. Otherwise antibacterial activity of potassium phosphonate, fosethyl-Al and etephon was very low for all bacterial strains tested (MIC from 0.32 to 0.63 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>). Changes observed in plant tissues treated with phosphonates, after inoculation with *P. syringae* pv. *syringae*, and the low antibacterial activity of these compounds suggest a possible mode of action of phosphonates inducing plant defence responses during interaction with *P. syringae*.



# ÍNDIX

---

<b>INTRODUCCIÓ GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Patogènia de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i></b> .....	<b>1</b>
<b>2. Característiques taxonòmiques de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i></b> .....	<b>5</b>
<b>3. Interacció <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> - planta</b> .....	<b>6</b>
3.1. Aspectes epidemiològics.....	6
3.2. Aspectes patogènics.....	8
3.2.1. Mecanismes de la patogènia de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en cèl·lules vegetals.....	9
3.2.2. Canvis produïts en la planta per l'activitat patogènica de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	12
3.3.3. Regulació gènica de la patogènia de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	14
<b>4. Mètodes de control de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i></b> .....	<b>17</b>
4.1. Selecció de varietats i material vegetal.....	17
4.2. Mesures culturals.....	18
4.3. Control químic.....	18
4.4. Control biològic.....	19
4.5. Perspectives del control.....	20
<b>OBJECTIUS GENERALS</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPÍTOL 1. DESENVOLUPAMENT DE SISTEMES MODEL I METODOLOGIES PER A L'ESTUDI DE LA INTERACCIÓ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> -PERERA</b> .....	<b>23</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>23</b>
<b>1. Factors que afecten la interacció</b> .....	<b>23</b>
<b>2. Metodologies per a l'estudi de la interacció</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Aplicació de les metodologies desenvolupades a l'estudi de la interacció <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>-perera</b> .....	<b>27</b>
<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>28</b>
<b>MATERIAL I MÈTODES</b> .....	<b>29</b>
<b>1. Efecte de l'edat de la fulla i de la temperatura d'incubació en la infecció</b> .....	<b>29</b>
1.1. Material vegetal.....	29
1.2. Inòcul.....	29
1.3. Inoculacions i incubació.....	30
1.4. Avaluació de la infecció.....	30
1.5. Disseny experimental i anàlisi estadística.....	31
<b>2. Sensibilitat de varietats europees de perera a <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> i virulència de diferents aïllats del bacteri</b> .....	<b>32</b>
2.1 Material vegetal.....	32
2.2. Inòcul.....	33

2.2.1. Obtenció de cultius del bacteri en medi sòlid.....	33
2.2.2. Obtenció de suspensions.....	34
2.3. Inoculacions i incubació.....	35
2.4. Avaluació de la infecció.....	36
2.5. Disseny experimental.....	37
2.6. Anàlisi estadística.....	39
<b>3. Desenvolupament d'una metodologia per a l'estudi de la interacció <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>-perera en planta.....</b>	<b>41</b>
3.1. Efecte de la dosi de patogen i de l'edat de la fulla en la severitat.....	41
3.1.1. Material vegetal.....	41
3.1.2. Inòcul.....	41
3.1.3. Inoculacions i incubació de les plantes.....	42
3.1.4. Avaluació de la severitat de la malaltia.....	43
3.1.5. Disseny experimental.....	44
3.1.6. Anàlisi estadística.....	44
3.2. Cinètica de la multiplicació de <i>P. syringae</i> en perera.....	45
3.2.1. Material vegetal.....	45
3.2.2. Inòcul.....	45
3.2.3. Inoculació i incubació de les plantes.....	46
3.2.4. Avaluació de la supervivència i multiplicació bacteriana en les plantes de perera inoculades.....	46
3.2.5. Disseny experimental.....	46
3.2.6. Anàlisi estadística.....	46
3.3. Desenvolupament de símptomes i canvis estructurals en els teixits de fulla de perera durant la interacció.....	47
<b>4. Estudi de la interacció <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>-perera mitjançant la infiltració de discs foliars i pèrdua d'electròlits.....</b>	<b>48</b>
4.1. Material vegetal.....	48
4.2. Inòcul.....	48
4.3. Infiltració de les suspensions bacterianes en els discs de fulla.....	49
4.4. Recompte de la quantitat de bacteris infiltrats per disc de fulla.....	49
4.5. Determinació dels canvis en la permeabilitat dels teixits de discs de fulla.....	50
4.6. Disseny experimental.....	50
4.7. Tractament de les dades i anàlisi estadística.....	50
4.7.1. Anàlisi de la cinètica de pèrdua d'electròlits.....	51
<b>RESULTATS.....</b>	<b>55</b>
<b>1. Efecte de la temperatura en la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en perera.....</b>	<b>55</b>
<b>2. Efecte de l'edat de la fulla en la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en perera.....</b>	<b>56</b>
<b>3. Sensibilitat de varietats europees de perera a <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> i virulència de diferents aïllats del patogen.....</b>	<b>58</b>
3.1. Fruits immadurs.....	58
3.1.1. Sensibilitat varietal.....	58
3.1.2. Virulència del patogen.....	63
3.2. Fulles.....	68
3.2.1. Sensibilitat varietal.....	71
3.2.2. Virulència del patogen.....	77
<b>4. Metodologia per a l'estudi de la interacció <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>-perera.....</b>	<b>83</b>
4.1. Efecte de la dosi d'inòcul en la severitat de la malaltia en planta.....	83
4.2. Efecte de l'edat de la fulla en la severitat de la infecció.....	85
4.3. Evolució de la població bacteriana en plantes inoculades.....	88

4.4. Desenvolupament de símptomes i infeccions.....	90
4.5. Canvis estructurals en els teixits de fulles de perera durant la interacció.....	92
4.6. Canvis en la permeabilitat cel·lular dels teixits de fulla de perera durant la interacció amb <i>P. syringae</i> .....	104
4.6.1. Efecte del tipus d'interacció en la capacitat final de sortida d'electròlits dels teixits de fulla de perera.....	105
4.6.2. Determinació dels paràmetres cinètics i bondat de l'ajust.....	106
4.6.3. Anàlisi estadística de l'efecte del tipus d'interacció bacteri-perera en la taxa de sortida d'electròlits.....	107
4.6.4. Anàlisi estadística de l'efecte del tipus d'interacció bacteri-perera en el temps de pèrdua mitjana d'electròlits ( $t_{50}$ ).....	108
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	109
<b>1. Factors que afecten la interacció <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>-perera</b> .....	109
1.1. Efecte de la temperatura.....	109
1.2. Efecte de l'edat de la fulla.....	111
1.3. Sensibilitat de varietats de perera a <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> i virulència del patogen.....	111
<b>2. Desenvolupament d'una tècnica d' inoculació de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en planta sencera de perera</b> .....	118
<b>3. Multiplicació bacteriana i desenvolupament de símptomes en la interacció <i>P. syringae</i>-perera</b> .....	121
<b>4. Canvis estructurals en els teixits de perera durant la interacció amb <i>P. syringae</i></b> .....	123
<b>5. Canvis en la permeabilitat cel·lular dels teixits de perera durant la interacció</b> .....	129
<b>CAPÍTOL 2. ACTIVITAT DE DERIVATS DEL FOSFONAT EN LA INTERACCIÓ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>-PERERA</b> .....	133
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	133
<b>OBJECTIUS</b> .....	138
<b>MATERIAL I MÈTODES</b> .....	139
<b>1. Efecte dels fosfonats en la virulència de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en plantes de perera</b> .....	139
1.1. Material vegetal i tractaments amb fosfonats.....	139
1.2. Inòcul.....	140
1.3. Inoculacions i incubació.....	140
1.4. Disseny experimental.....	140
1.5. Avaluació de la virulència del patogen.....	140
1.6. Anàlisi estadística.....	141
<b>2. Efecte dels fosfonats en la multiplicació de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en plantes de perera</b> .....	143
2.1. Material vegetal i tractament amb fosfonats.....	143
2.2. Inòcul.....	143
2.3. Inoculacions i incubació.....	143
2.4. Avaluació de la supervivència i multiplicació dels bacteris en les plantes de perera.....	144
2.5. Disseny experimental.....	144
2.6. Anàlisi estadística.....	144

<b>3. Efecte dels fosfonats en els canvis estructurals en els teixits de fulla de perera durant la interacció amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i></b> .....	<b>145</b>
<b>4. Efecte dels fosfonats en la permeabilitat de discs foliars durant la interacció amb <i>P. syringae</i></b> .....	<b>145</b>
4.1. Material vegetal.....	145
4.2. Tractament de les plantes amb fosfonats.....	147
4.3. Inòcul.....	147
4.4. Infiltració de les suspensions bacterianes en el material vegetal.....	148
4.5. Recompte de la quantitat de bacteris infiltrats per disc de fulla.....	148
4.6. Incubació dels discs de fulla infiltrats amb bacteris.....	149
4.7. Determinació dels canvis de permeabilitat cel·lular.....	149
4.8. Disseny experimental.....	149
4.9. Tractament de les dades i anàlisi estadística.....	150
<b>5. Efecte dels fosfonats en la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en perera</b> .....	<b>152</b>
5.1. Material vegetal.....	153
5.2. Tractaments amb fosfonats.....	154
5.3. Determinació del pH del substrat en les plantes regades amb fosfonats.....	158
5.4. Inòcul.....	158
5.5. Inoculacions i incubació del material vegetal inoculat.....	159
5.6. Disseny experimental.....	160
5.7. Avaluació de la severitat de la infecció.....	161
5.8. Anàlisi estadística.....	162
<b>6. Activitat antibacteriana <i>in vitro</i> dels fosfonats</b> .....	<b>164</b>
6.1. Inhibició del creixement bacterià per la incorporació de fosfonats en medi sòlid.....	164
6.1.1. Obtenció de cultius purs dels bacteris en medi sòlid.....	164
6.1.2. Incorporació dels productes en el medi de creixement.....	164
6.1.3. Avaluació de l'activitat inhibidora del creixement bacterià pels fosfonats.....	166
6.1.4. Disseny experimental.....	166
6.1.5. Determinació del contingut en fosfats del medi CYE.....	166
6.1.6. Determinació del pH del medi CYE amb fosfonats afegits.....	167
6.2. Supervivència de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en solucions aquoses de fosfonats.....	167
6.2.1. Solucions de fosfonats.....	167
6.2.2. Suspensions bacterianes en solucions de fosfonats.....	167
6.2.3. Avaluació de la supervivència de les suspensions bacterianes en les solucions amb fosfonats.....	168
6.2.4. Determinació del pH de solucions de fosfonats a diferents concentracions.....	168
6.2.5. Disseny experimental i anàlisi estadística.....	168
<b>RESULTATS</b> .....	<b>169</b>
<b>1. Virulència de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en plantes de perera tractades amb fosfonats</b> .....	<b>169</b>
1.1. Efecte del fosetil-Al.....	169
1.2. Efecte de diferents fosfonats.....	171
<b>2. Multiplicació de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en plantes de perera tractades amb fosfonats</b> .....	<b>176</b>
<b>3. Canvis estructurals en els teixits de perera durant la interacció amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>. Efecte dels fosfonats</b> .....	<b>179</b>
3.1. Síntomes macroscòpics.....	179
3.2. Síntomes microscòpics.....	181
3.3. Canvis ultraestructurals.....	184

<b>4. Efecte dels fosfonats en els canvis en la permeabilitat cel·lular dels teixits de la planta durant la interacció amb el patogen</b> .....	<b>197</b>
4.1. Efecte del tipus d'interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en la pèrdua final d'electròlits dels teixits de la planta.....	203
4.2. Efecte dels fosfonats en la cinètica de sortida d'electròlits en discs de fulla infiltrats amb bacteris.....	206
4.2.1. Determinació de la conductivitat màxima en cada experiment.....	206
4.2.2. Determinació dels paràmetres cinètics i bondat de l'ajust al model monomolecular.....	207
4.2.3. Anàlisi estadística de l'efecte del tipus d'interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en la cinètica de sortida d'electròlits.....	212
4.2.4. Anàlisi estadística de l'efecte de la interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en el temps de pèrdua mitjana d'electròlits en discs foliars ( $t_{50}$ ).....	215
<b>5. Activitat dels fosfonats en el control de la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en perera</b> .....	<b>218</b>
5.1. Efecte del fosetil-Al aplicat a diferents concentracions.....	218
5.1.1. Branques forçades a floració.....	218
5.1.2. Plantes de perera mantingudes en hivernacle.....	222
5.2. Efecte del fosfonat potàssic aplicat a diferents concentracions.....	225
5.3. Efecte de diferents fosfonats aplicats a la mateixa dosi.....	228
5.4. pH del substrat de les plantes regades amb fosfonats.....	231
5.5. Efecte de la dosi d'aplicació de diversos fosfonats.....	233
5.6. Efecte de la cadència d'aplicació dels fosfonats.....	242
5.7. Efecte del fosetil-Al aplicat a camp en pereres de diferents varietats.....	248
<b>6. Activitat antibacteriana <i>in vitro</i> dels fosfonats</b> .....	<b>253</b>
6.1. Inhibició del creixement bacterià per la incorporació dels fosfonats en medi sòlid.....	253
6.2. Supervivència de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en solucions aquoses de fosfonats.....	254
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	<b>259</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>273</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>277</b>

## LLISTAT DE TAULES

---

<b>Taula 1.</b> Espècies vegetals en les que s'ha descrit la malaltia causada per <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	2
<b>Taula 2.</b> Treballs en els que s'han estudiat els canvis en la permeabilitat de la cèl·lula vegetal durant la interacció amb els bacteris fitopatògens <i>P. syringae</i> i <i>E. amylovora</i> .....	13
<b>Taula 1.1.</b> Índexs de severitat utilitzats per avaluar la intensitat de la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fulles de perera separades de la planta .....	31
<b>Taula 1.2.</b> Procedència de les soques de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> utilitzades en les inoculacions .....	34
<b>Taula 1.3.</b> Principals característiques bioquímiques de les soques de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> utilitzades .....	35
<b>Taula 1.4.</b> Índexs de severitat ( <i>Is</i> ) utilitzats per avaluar la intensitat de la infecció de diferents soques de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fulles i fruits de varietats de perera .....	37
<b>Taula 1.5.</b> Descripció dels índexs de severitat utilitzats per avaluar la intensitat de la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fulles en plantes de perera inoculades per microinfiltració localitzada .....	43
<b>Taula 1.6.</b> Efecte de la temperatura i la soca de patogen en la severitat de la infecció en fulles de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	55
<b>Taula 1.7.</b> Efecte de l'edat de la fulla en la severitat de la infecció en inocular <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fulles de plantes de perera de la varietat Conference .....	57
<b>Taula 1.8.</b> Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fruits de diferents varietats de perera inoculats amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	59
<b>Taula 1.9.</b> Anàlisi del model loglineal obtingut per relacionar la severitat de les infeccions en fruits amb la varietat de perera i la soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	60
<b>Taula 1.10.</b> Efecte de la varietat de perera i la soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en la severitat de la infecció en fruits immadurs .....	60
<b>Taula 1.11.</b> Anàlisi dels models loglineals obtinguts per cada soca de patogen que relacionen l'índex de severitat de la infecció en fruits immadurs amb la varietat de perera .....	61
<b>Taula 1.12.</b> Efecte de la varietat de perera en la severitat de la infecció en fruits immadurs en inocular <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	61
<b>Taula 1.13.</b> Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fruits de quatre varietats de perera inoculats amb diferents soques de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	64
<b>Taula 1.14.</b> Anàlisi del model obtingut per relacionar l'índex de severitat en fruits immadurs amb la varietat de perera i la soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	65
<b>Taula 1.15.</b> Efecte de la varietat de perera i la soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en la severitat de la infecció en fruits immadurs .....	65

<b>Taules 1.16. i 1.17.</b> Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fulles de varietats europees de perera inoculades amb diferents soques de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	69
<b>Taula 1.18.</b> Anàlisi del model obtingut per relacionar l'índex de severitat de la infecció amb la varietat de perera i la soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	71
<b>Taula 1.19.</b> Efecte de la varietat de perera i la soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en la severitat de la infecció en fulles .....	71
<b>Taula 1.20.</b> Anàlisi dels models obtinguts per cada soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> per relacionar l'índex de severitat de la infecció en fulles amb la varietat de perera .....	72
<b>Taula 1.21.</b> Efecte de la varietat de perera en la severitat de la infecció en fulles en inocular diferents soques de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	73
<b>Taula 1.22</b> Anàlisi del models obtinguts per relacionar l'índex de severitat de la infecció en fulles de varietats de perera amb la soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	77
<b>Taula 1.23.</b> Efecte de la soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en la severitat de la infecció en fulles de diferents varietats de perera .....	78
<b>Taula 1.24.</b> Efecte de la dosi de patogen en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	83
<b>Taula 1.25.</b> Determinació de la dosi infectiva mitjana ( $DE_{50}$ ) de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference.....	84
<b>Taula 1.26.</b> Efecte de la posició de la fulla en la planta i de la dosi de patogen en la severitat de la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference .....	85
<b>Taula 1.27.</b> Efecte de l'edat de la fulla i la dosi de patogen en la severitat de la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference .....	85
<b>Taula 1.28.</b> Efecte del tipus de bacteri i la dosi d'inòcul en la multiplicació al llarg del temps de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 i <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68 en fulles de plantes de perera de la varietat Conference .....	89
<b>Taula 1.29.</b> Efecte del tipus d'interacció en la sortida d'electròlits de discs de fulla de plantes de perera infiltrats amb diferents bacteris .....	104
<b>Taula 1.30.</b> Paràmetres i ajust del model matemàtic utilitzat per definir la cinètica de sortida d'electròlits en discs de fulles de plantes de perera infiltrats amb diversos bacteris .....	106
<b>Taula 1.31.</b> Efecte del tipus d'interacció bacteri-perera en la taxa de sortida d'electròlits de discs de fulla infiltrats amb diferents bacteris .....	107
<b>Taula 1.32.</b> Efecte del tipus d'interacció bacteri-perera en el $t_{50}$ en discs de fulla de plantes de perera de la varietat Passe Crassane infiltrats diferents bacteris .....	108
<b>Taula 1.33.</b> Sensibilitat de les principals varietats europees de perera a <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>E. amylovora</i> i <i>Stemphylium vesicarium</i> .....	116
<b>Taula 2.1.</b> Algunes malalties en les que els fosfonats, principalment el fosetil-Al, s'han mostrat efectius en el seu control .....	134

<b>Taula 2.2.</b> Interaccions bacteri-planta i tipus de resposta desenvolupada en l'experiment per a la determinació de l'efecte dels fosfonats en la permeabilitat cel·lular de discs foliars de diferents plantes .....	146
<b>Taula 2.3.</b> Procedència dels bacteris utilitzats en la determinació dels canvis en la permeabilitat de discs foliars de diferents plantes .....	148
<b>Taula 2.4.</b> Experiments realitzats per determinar l'activitat de diversos fosfonats en la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en perera .....	152
<b>Taula 2.5.</b> Tractaments realitzats per a l'avaluació de l'efecte dels fosfonats en la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en perera .....	155
<b>Taula 2.6.</b> Índexs de severitat utilitzats per avaluar la intensitat de la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fulles de perera separades de la planta .....	162
<b>Taula 2.7.</b> Procedència de les soques bacterianes utilitzades en l'avaluació de la capacitat inhibidòria del creixement bacterià <i>in vitro</i> per diferents fosfonats .....	165
<b>Taula 2.8.</b> Efecte del tractament amb fosetil-Al i de la dosi de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference .....	169
<b>Taula 2.9.</b> Dosis de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 necessàries per obtenir nivells de severitat de la malaltia del 50% i del 90% ( $DE_{50}$ i $DE_{90}$ ) en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosetil-Al .....	171
<b>Taula 2.10.</b> Efecte del producte, la dosi de patogen i l'edat de la fulla en la severitat de la malaltia en fulles en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb diferents fosfonats i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	173
<b>Taula 2.11.</b> Efecte dels fosfonats en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 a diferents dosis .....	174
<b>Taula 2.12.</b> Efecte de diferents fosfonats en la dosi infectiva mitjana ( $DE_{50}$ ) de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference .....	174
<b>Taula 2.13.</b> Efecte dels fosfonats i la dosi de patogen en la multiplicació de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 en fulles en plantes de perera de la varietat Conference .....	176
<b>Taula 2.14.</b> Efecte del tipus de bacteri infiltrat i del tractament amb fosetil-Al en la sortida d'electròlits de discs de fulla de plantes de tabac i perera .....	204
<b>Taula 2.15.</b> Efecte del tipus de bacteri infiltrat i del tractament amb fosfonats en la sortida d'electròlits de discs de fulles de diferents varietats de mongetera .....	205
<b>Taula 2.16.</b> Paràmetres i ajust de l'equació als valors de conductivitat al llarg del temps en discs de fulles de plantes de tabac infiltrats amb bacteris .....	207
<b>Taules 2.17, 2.18 i 2.19.</b> Paràmetres i ajust de l'equació als valors de conductivitat al llarg del temps en discs de fulles de plantes de perera en funció del bacteri infiltrat i del tractament amb fosfonats .....	208
<b>Taula 2.20.</b> Paràmetres i ajust de l'equació als valors de conductivitat al llarg del temps en discs de fulles de plantes de diferents varietats de mongetera infiltrats amb diferents bacteris .....	211



<b>Taula 2.21.</b> Paràmetres i ajust de l'equació als valors de conductivitat al llarg del temps en discs de fulles de plantes de mongetera de la varietat Michelet en funció del bacteri infiltrat i del tractament amb fosfonats .....	212
<b>Taula 2.22.</b> Efecte del tipus d'interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en la cinètica de sortida d'electròlits dels discs de fulla .....	213
<b>Taula 2.23.</b> Efecte de la varietat de mongetera, el bacteri infiltrat i el tractament de les plantes amb fosfonats en la cinètica de sortida d'electròlits en discs de fulla.....	214
<b>Taula 2.24.</b> Efecte del tipus d'interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en el temps de pèrdua mitjana d'electròlits ( $t_{50}$ ) en discs de fulla de diferents espècies vegetals .....	216
<b>Taula 2.25.</b> Efecte del tipus d'interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en el temps de pèrdua mitjana d'electròlits ( $t_{50}$ ) de discs de fulla de diferents varietats de mongetera .....	217
<b>Taula 2.26.</b> Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fulles de branques de perera de la varietat Grand Champion forçades a floració en solucions amb fosetil-Al a diferents concentracions i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	219
<b>Taula 2.27.</b> Efecte de la dosi de fosetil-Al en la severitat de la infecció en fulles de branques de perera de la varietat Grand Champion forçades a floració i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	219
<b>Taula 2.28.</b> Dosi efectiva mitjana ( $DE_{50}$ ) de fosetil-Al en fulles de branques de perera de la varietat Grand Champion forçades a floració i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	221
<b>Taula 2.29.</b> Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació amb fosetil-Al a diferents concentracions i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	223
<b>Taula 2.30.</b> Efecte de la concentració de fosetil-Al en la severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	223
<b>Taula 2.31.</b> Dosi efectiva mitjana ( $DE_{50}$ ) de fosetil-Al en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference regades amb fosetil-Al a diferents concentracions i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	224
<b>Taula 2.32.</b> Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació amb fosfonat potàssic a diferents concentracions i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	226
<b>Taula 2.33.</b> Efecte de la dosi de fosfonat potàssic en la severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	226
<b>Taula 2.34.</b> Dosi efectiva mitjana ( $DE_{50}$ ) de fosfonat potàssic en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	227
<b>Taula 2.35.</b> Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en inocular les soques EPS17a i EPS94 de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació amb diferents fosfonats .....	229
<b>Taula 2.36.</b> Efecte de diferents fosfonats en la severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	229

<b>Taula 2.37.</b> Efecte del tractament per irrigació amb fosfonats en el pH del substrat de plantes de perera .....	232
<b>Taula 2.38.</b> pH del substrat de plantes de la varietat Conference regades amb diferents fosfonats .....	232
<b>Taules 2.39. i 2.40.</b> Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en les inoculacions de fulles en plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació amb fosfonats a diferents concentracions i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	235
<b>Taula 2.41.</b> Efecte del producte, la dosi i l'edat de la fulla en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfonats a diferents dosis i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	239
<b>Taula 2.42.</b> Efecte del tipus de fosfonat i la dosi en la severitat de la malaltia en cada tipus de fulla de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	239
<b>Taula 2.43.</b> Severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 en funció del tipus i dosi de fosfonat.....	214
<b>Taula 2.44.</b> Dosi efectiva mitjana ( $DE_{50}$ ) i del 90% ( $DE_{90}$ ) pels diferents fosfonats en el control de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference .....	241
<b>Taula 2.45.</b> Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en inoculacions en fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfonats amb diferents cadències d'irrigació i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	243
<b>Taula 2.46.</b> Efecte de la cadència d'aplicació de diferents fosfonats en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	245
<b>Taula 2.47.</b> Severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfonats amb diferents cadències i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	246
<b>Taula 2.48.</b> Freqüència dels índexs de severitat de la infecció ( <i>Is</i> ), en funció del tractament amb foseetil-Al, en fulles de pereres de diferents varietats inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	248
<b>Taula 2.49.</b> Ajust del model obtingut per relacionar la severitat de la infecció en fulles d'arbres de diferents varietats de perera, amb la varietat de perera, la soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> i el tractament amb foseetil-Al .....	249
<b>Taula 2.50.</b> Efecte del tractament amb foseetil-Al en la severitat de la infecció en fulles d'arbres de diferents varietats, en funció de la varietat de perera i la soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	249
<b>Taula 2.51.</b> Efecte de la soca de patogen i del tractament amb foseetil-Al en la severitat de la infecció en inocular <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fulles d'arbres de diferents varietats de perera tractats a camp .....	250
<b>Taula 2.52.</b> Concentració mínima inhibidora del creixement de diferents bacteris per l'estreptomicina, fosfomicina, fosfonat potàssic, foseetil-Al i etefon en medi CYE .....	253
<b>Taula 2.53.</b> Efecte de la concentració de fosfonat, de la soca bacteriana i del temps d'exposició en la supervivència de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en solucions de foseetil-Al i fosfonat potàssic a diferents concentracions .....	256
<b>Taula 2.54.</b> Efecte del pH de les solucions de fosfonats en la supervivència de les soques EPS17a i EPS94 de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en funció del temps d'exposició a les solucions .....	258

## LLISTAT DE FIGURES

---

<b>Figura 1.</b> Síntomes de la malaltia causada per <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en perera .....	4
<b>Figura 2.</b> Model de la reacció d'hipersensibilitat en plantes induïda per bacteris .....	16
<b>Figura 1.1.</b> Procediment per a la inoculació de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> i l'avaluació de la infecció en fulles de perera separades de la planta .....	38
<b>Figura 1.2.</b> Procediment utilitzat en les inoculacions de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fruits immadurs de perera .....	40
<b>Figura 1.3.</b> Esquema dels components de l'aparell utilitzat per a la microinfiltració de suspensions bacterianes en fulles de plantes de perera .....	42
<b>Figura 1.4.</b> Corbes de la cinètica de la conductivitat per diferents valors dels paràmetres $K_0$ i $b$ del model monomolecular amb taxa variable en el temps .....	53
<b>Figura 1.5.</b> Severitat de la infecció en funció de la temperatura d'incubació.....	56
<b>Figura 1.6.</b> Severitat de la infecció en funció de l'edat de la fulla .....	57
<b>Figura 1.7.</b> Sensibilitat de fruits immadurs de diferents varietats de perera a <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> ....	62
<b>Figura 1.8.</b> Virulència de soques de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fruits immadurs de diferents varietats de perera .....	66
<b>Figura 1.9.</b> Síntomes de la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fruits immadurs de diferents varietats de perera .....	67
<b>Figura 1.10.</b> Sensibilitat de fulles de diferents varietats de perera a les soques 1392, S8 i EPS17a de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	74
<b>Figura 1.11.</b> Sensibilitat de fulles de diferents varietats de perera a les soques EPS94 i EPSMV4 de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	75
<b>Figura 1.12.</b> Sensibilitat de fulles de diferents varietats de perera a les soques 2027.37 i EPSLL3Y de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	76
<b>Figura 1.13.</b> Virulència de soques de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en ser inoculades en fulles de diferents varietats de perera .....	79
<b>Figura 1.14.</b> Virulència de soques de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en ser inoculades en fulles de diferents varietats de perera .....	80
<b>Figura 1.15.</b> Síntomes de la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fulles de diferents varietats de perera.....	81
<b>Figura 1.16.</b> Virulència de les soques EPS94, EPSMV4, EPS17a, EPSLL3Y i 1392 de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fulles de perera de les varietats Comice i Conference .....	82
<b>Figura 1.17.</b> Relació dosi-resposta entre els nivells de malaltia i la dosi de patogen en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	84

<b>Figura 1.18.</b> Severitat de la infecció en funció de la posició de la fulla en la planta i de l'edat de la fulla .....	86
<b>Figura 1.19.</b> Evolució de la població de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 i <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68 inoculats en plantes de perera de la varietat Conference .....	88
<b>Figura 1.20.</b> Síntomes macroscòpics de la inoculació per microinfiltració localitzada en fulles de plantes de perera de la varietat Conference dels bacteris <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> i <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68 .....	91
<b>Figura 1.21.</b> Talls transversals semifins de fulles de plantes de perera de la varietat Conference realitzats a les 48 hores de la inoculació per microinfiltració dels bacteris <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 (interacció compatible) i <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68 (interacció incompatible) .....	93
<b>Figura 1.22.</b> Micrografies al microscopi electrònic de rastreig de la superfície de fulles de plantes de perera de la varietat Conference a les 48 hores de la inoculació per microinfiltració amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	95
<b>Figura 1.23.</b> Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil·le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	96
<b>Figura 1.24.</b> Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil·le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68 .....	97
<b>Figura 1.25.</b> Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulla de perera infiltrats amb aigua destil·lada estèril .....	100
<b>Figura 1.26.</b> Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulla de perera infiltrats amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	101
<b>Figura 1.27.</b> Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulla de perera infiltrats amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	102
<b>Figura 1.28.</b> Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulla de perera infiltrats amb <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68 .....	103
<b>Figura 1.29.</b> Efecte del tipus d'interacció i la virulència del bacteri en la sortida d'electròlits en perera .....	104
<b>Figura 2.1.</b> Estructura de l'anió fosfonat i de derivats de l'àcid fosfònic .....	134
<b>Figura 2.2.</b> Procediment utilitzat per a la determinació de l'efecte dels fosfonats en la multiplicació i virulència de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en perera .....	142
<b>Figura 2.3.</b> Relació dosi-resposta entre la severitat de la malaltia i la dosi de patogen en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fasetil-Al o no tractades, inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	170
<b>Figura 2.4.</b> Relació dosi-resposta entre la severitat de la malaltia per planta i la dosi de patogen en les fulles joves i les fulles velles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb diferents fosfonats i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	172
<b>Figura 2.5.</b> Multiplicació de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb diferents fosfonats .....	177

<b>Figura 2.6.</b> Síntomes de la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 als 7 dies de la inoculació per microinfiltració en fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosetil-Al, etefon , fosfomicina, i no tractades.....	180
<b>Figura 2.7.</b> Talls semifins de fulles de plantes de perera de la varietat Conference a les 48 hores de la inoculació per microinfiltració de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94.....	182
<b>Figura 2.8.</b> Talls semifins de fulles de plantes de perera de la varietat Conference a les 48 hores de la inoculació per microinfiltració de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	183
<b>Figura 2.9.</b> Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil-le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	185
<b>Figura 2.10.</b> Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil-le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosetil-Al i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	186
<b>Figura 2.11.</b> Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil-le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfonat potàssic i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	187
<b>Figura 2.12.</b> Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil-le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfomicina i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	188
<b>Figura 2.13.</b> Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil-le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb etefon i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 ....	189
<b>Figura 2.14.</b> Microelectrografia al microscopi electrònic de transmissió d'un tall ultrafi de fulla de perera infiltrat amb aigua destil·lada estèril .....	192
<b>Figura 2.15.</b> Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulla de plantes de perera no tractades amb fosfonats infiltrats amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	193
<b>Figura 2.16.</b> Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulla de plantes de perera tractades amb fosfonat potàssic infiltrats amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	194
<b>Figura 2.17.</b> Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulla de plantes de perera tractades amb etefon infiltrats amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	195
<b>Figura 2.18.</b> Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulla de plantes de perera tractades amb fosfomicina infiltrats amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	196
<b>Figura 2.19.</b> Efecte del tipus de bacteri i del tractament amb fosetil-Al en la sortida d'electròlits en discs de fulles de plantes de tabac de la varietat Xanthi .....	197
<b>Figura 2.20.</b> Efecte del tipus de bacteri infiltrat i del tractament amb fosetil-Al en la sortida d'electròlits en discs de fulles de plantes de perera de la varietat Passe Crassane (I).....	198
<b>Figura 2.21.</b> Efecte del tipus de bacteri infiltrat i del tractament amb fosetil-Al en la sortida d'electròlits en discs de fulles de plantes de perera de la varietat Passe Crassane (II).....	199
<b>Figura 2.22.</b> Efecte de la varietat de mongetera, el tipus de bacteri i el tractament amb fosfonats en la sortida d'electròlits .....	200

<b>Figura 2.23.</b> Severitat de la infecció en funció de la dosi de fosetil-Al en fulles de branques de perera de la varietat Grand Champion portades a floració en solucions amb fosetil-Al a diferents concentracions i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	221
<b>Figura 2.24.</b> Severitat de la infecció en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosetil-Al a diferents concentracions i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	224
<b>Figura 2.25.</b> Severitat de la infecció en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfonat potàssic i inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	227
<b>Figura 2.26.</b> Severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb diferents fosfonats inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	230
<b>Figura 2.27.</b> Efecte de la concentració de diferents fosfonats en la severitat de la malaltia en fulles joves i velles de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 .....	237
<b>Figura 2.28.</b> Efecte de la cadència d'aplicació dels fosfonats en la severitat de la malaltia en inocular <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference .....	245
<b>Figura 2.29.</b> Síntomes de la inoculació de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 per microinfiltració localitzada en fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb diferents fosfonats .....	247
<b>Figura 2.30.</b> Severitat de la infecció de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> en fulles d'arbres de diferents varietats de perera en funció del tractament amb fosetil-Al .....	251
<b>Figura 2.31.</b> Supervivència de les soques EPS17a i EPS94 de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> exposades a solucions de fosfonat potàssic i fosetil-Al de diferents concentracions .....	255
<b>Figura 2.32.</b> pH del medi CYE i de les solucions aquoses amb fosfonats a diferents concentracions .....	257

# INTRODUCCIÓ GENERAL

---

## 1. Patogènia de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* és un bacteri epífit present en la superfície de moltes plantes cultivades i espontànies que té capacitat de multiplicar-se sense penetrar-hi (Lindow i col., 1978; Yankofsky i col., 1981; Lindemann i col., 1984; Malvick i Moore, 1988; Hirano i col., 1995). Ha estat descrit com agent causant de diverses malalties necrotitzants en més de 200 espècies vegetals (Bradbury, 1986), entre les quals s'hi troben arbres fruiters com cítrics (taronger, llimoner), presseguer, cirerer, pomera, perera i mango, espècies ornamentals i conreus herbacis com mongetera, userda i pèsol. A la Taula 1 s'indiquen algunes espècies vegetals en que *P. syringae* pv. *syringae* és patogen (a partir de Bradbury, 1986; Lelliott i Stead, 1987 i López i Montesinos, 1996).

En perera s'ha descrit com agent causant de la necrosi bacteriana (en anglès anomenada 'bacterial blast of pear' i en francès 'dépérissement bactérien du poirier'). Aquesta malaltia ha estat descrita en la majoria de zones productores de pera del món, provocant un debilitament dels arbres i una disminució de la productivitat, essent fins i tot una barrera important per a l'expansió del cultiu en algunes zones. Països en els que ha provocat atacs greus són França (Ridé i Sutic, 1957), Anglaterra (Barker i Grove, 1914), Itàlia (Ercolani, 1967), Grècia (Cameron, 1962), Estats Units (Wilson, 1936), Xile (Waissbluth i Latorre, 1978), Sud-Àfrica (Mansvelt i Hattingh, 1986), Nova Zelanda (Dye, 1956) i Austràlia (Fahy i Lloyd, 1983). A l'estat espanyol també s'ha observat la malaltia (López i Montesinos, 1996).

La necrosi bacteriana de la perera es manifesta amb diferent simptomatologia en funció del teixit o òrgan afectat i l'estat vegetatiu de l'hoste. En escorça sol manifestar-se a finals de tardor i durant l'hivern formant un xancre. A la primavera, en floració, causa necrosis localitzades en flors, fruits immadurs i fulles provocant pèrdues significatives de

fruits (Luisetti i Paulin, 1972; Manceau i col., 1990). En les fulles s'observen taques arrodonides, brunes, que deformen la fulla a mesura que aquesta es desenvolupa. En fruits es formen taques negres superficials. Tant les fulles com els fruits solen ser atacats quan són joves o immadurs. En flors s'observen necrosis que solen iniciar-se en el calze i s'extenen pels estams i pel peduncle arribant a afectar tota la flor i el corimbe. En la nostra zona geogràfica s'ha observat poc aquesta simptomatologia, però s'ha relacionat el bacteri amb la necrosi de borrons de flor de la perera (Montesinos i Vilardell, 1988).

**Taula 1.** Espècies vegetals en les que s'ha descrit la malaltia causada per *P. syringae* pv. *syringae* (Bradbury, 1986; Lelliott i Stead, 1987; López i Montesinos, 1996)

<i>Fruiters</i>	<i>Plantes herbàcies</i>	<i>Ornamentals</i>
Alvocat ( <i>Persea indica</i> )	Blat de moro ( <i>Zea mays</i> )	Llorer ( <i>Laurus nobilis</i> )
Círerer ( <i>Prunus avium</i> )	Ceba ( <i>Allium cepa</i> )	Magnòlia ( <i>Magnolia</i> sp.)
Llimoner ( <i>Citrus limon</i> )	Fava ( <i>Vicia faba</i> )	Xeringuilla ( <i>Philadelphus coronarius</i> )
Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	Maduixera ( <i>Fragaria vesca</i> )	Fotínia ( <i>Photinia</i> sp.)
Noguera ( <i>Juglans regia</i> )	Melca ( <i>Sorghum</i> sp.)	Pollancre ( <i>Populus</i> sp.)
Perera ( <i>Pyrus communis</i> )	Mongetera ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Rododendre ( <i>Rhododendron</i> sp.)
Plataner ( <i>Musa paradisiaca</i> )	Pebrot ( <i>Capsicum anum</i> )	<i>Rubus</i> spp.
Presseguer ( <i>Prunus persica</i> )	Pésol ( <i>Pisum sativum</i> )	Salzes ( <i>Salix</i> sp.)
Prunera ( <i>Prunus domestica</i> )	Porro ( <i>Allium porrum</i> )	<i>Syringa</i> spp.
Taronger dolç ( <i>Citrus aurantium</i> var. <i>dulcis</i> )	Remolatxa ( <i>Beta vulgaris</i> var. <i>rapa</i> )	Roser ( <i>Rosa</i> sp.)
Vinya ( <i>Vitis vinifera</i> )	Userda ( <i>Medicago sativa</i> )	

### ***La necrosi de borrons de flor de la perera***

Un dels principals problemes patològics de la perera a les comarques de Girona és la necrosi de borrons de flor. La simptomatologia afecta borrons de flor en dormició o prefloració provocant una destrucció total o parcial dels borrons a finals d'hivern i inicis de primavera. Els borrons de flor afectats queden avortats, es dessequen i perden les esquames i les bràctees més externes, podent arribar a caure prematurament deixant una cicatriu basal. Quan la incidència de la malaltia és elevada es produeix un retard en el desenvolupament vegetatiu dels arbres i apareixen brots axil·lars a la base dels borrons de flor necrosats (Montesinos i Vilardell, 1996).



Les primeres manifestacions de la malaltia a l'Estat Espanyol varen ser observades a Catalunya a finals dels anys setanta (Rovira, 1981). A Lleida les primeres manifestacions es van produir a finals dels anys vuitanta (Montesinos i Vilardell, 1991a; Vilardell i col., 1991). Altres zones de l'Estat Espanyol afectades per la malaltia des de principis dels noranta han estat la Vega del Guadiana a Extremadura (De la Cruz, 1991), la zona de Jumilla (Murcia) i la vall de l'Ebre (Zaragoza i Navarra) (Canals i Díaz, 1994). En els darrers anys s'han observat greus problemes en algunes zones del sud de França (valls de Rhône i Garone) i Brasil (vall del Rio Grande do Sul) (Montesinos i Vilardell, 1996). En totes aquestes zones la incidència de la malaltia ha estat elevada, podent suposar en algunes finques, més del 90% de borrons florals destruïts en el moment de la floració.

### *Causes de la malaltia*

Estudis realitzats durant més de 10 anys (Montesinos i Vilardell, 1996) només han pogut mostrar evidències de la relació de *P. syringae* pv. *syringae* amb la malaltia. Els primers estudis per a determinar l'origen patològic d'aquesta malaltia a les comarques de Girona van ser realitzats per Palazón (1986). Aquest va demostrar la presència de *P. syringae* pv. *syringae* en teixits infectats i que aquests bacteris produïen necrosis en fruits immadurs inoculats. Montesinos i Vilardell (1991b) van aïllar els bacteris epífits associats a la perera i d'entre els bacteris fitopatògens aïllats el 78% corresponia a *P. syringae* pv. *syringae* dels quals un 39 % tenia capacitat nucleadora de gel. Varen observar una relació significativa entre els nivells poblacionals de *P. syringae* pv. *syringae*, la quantitat de nuclis de gel en els borrons de flor dormits a començaments d'hivern i la incidència de la malaltia a la primavera. La inoculació artificial de branques de perera amb diferents aïllats del bacteri obtinguts de finques comercials de Girona i Lleida va reproduir els mateixos símptomes i danys observats a camp, però la inoculació per polvorització de parcel·les experimentals d'arbres en finques comercials sanes no va reproduir la malaltia (Montesinos i Vilardell, 1996).

Tot i això, els danys per anul·lació de borrons de flor no sempre s'han pogut relacionar exclusivament amb el factor patològic *P. syringae* pv. *syringae*. Estudiant una possible relació de la malaltia amb desequilibris o deficiències nutricionals de la perera es va observar que hi havia una relació inversa amb alguns paràmetres nutricionals (contingut en bor i sucres solubles dels borrons) i amb certs desequilibris durant el període vegetatiu, com un fort dessecament foliar a l'estiu (Montesinos i col., 1992). Això va permetre posar de manifest que la malaltia podia tenir una component patològica i una altra lligada a l'hoste.



**Figura 1.** Síntomes de la malaltia causada per *P. syringae* pv. *syringae* en perera. Necrosi localitzada de flors (a) i de flors i fulles (b). Branca de perera afectada per la necrosi de borrons de flor (c).

## 2. Característiques taxonòmiques de *P. syringae* pv. *syringae*

*P. syringae* és un bacil mòbil (amb flagel polar), Gram negatiu, aerobi, de la família de les Pseudomonadàcies, dels Proteobacteris. Pels seus caràcters bioquímics forma part del grup I (RNAr) d'aquesta família (Palleroni, 1984).

L'any 1966 Lelliott i col. van proposar el nom LOPAT (formació de levans, presència d'oxidasa, activitat pectolítica, arginina dihidrolasa i hipersensibilitat en tabac) per definir les característiques comunes de les espècies fluorescents del gènere *Pseudomonas*. Estudis posteriors (Sands i col., 1970) han permès agrupar la majoria de bacteris fluorescents fitopatògens en un grup, en funció dels caràcters LOPAT, en que la majoria són oxidasa negatius, arginina dihidrolasa negatius, donen positiu en el test d'hipersensibilitat en tabac i el resultat de la producció de levans és variable. L'espècie *P. syringae* pertany al grup Ia en tenir els caràcters LOPAT :+ - - - + (Lelliott i Stead, 1987).

L'elevat grau d'especialització d'hoste en *P. syringae*, en comparació amb altres bacteris del gènere *Pseudomonas* patògens d'animals (Palleroni, 1984), va portar a classificar els pseudomonats fluorescents fitopatògens dels grups 1 i 2 de Lelliott i col. (1966) en patovars en funció de la seva patogènia específica sobre un o diferents hostes (Young i col., 1978; Dye i col., 1980). *P. syringae* pv. *syringae* és un patovar amb característiques patogèniques específiques per un ampli grup d'hostes de famílies com gramínies, oleàcies, papilionàcies, rosàcies (entre els quals s'hi troba la perera), i rutàcies (Taula 1). La soca original (soca tipus) de *P. syringae* pv. *syringae* va ser aïllada de lesions en lilà (*Syringa vulgaris*) l'any 1902 (Palleroni, 1984).

La divisió de *P. syringae* en patovars en funció de l'especificitat per l'hoste ha estat avaluada per diferents autors. L'elevada variabilitat de caràcters fenotípics (tipus de nutrients utilitzats) observada entre aïllats de *P. syringae* pv. *syringae* provinents de diferents hostes (Gardan i col., 1990) ha fet necessaris estudis taxonòmics en base a caràcters fenotípics i genètics. En els darrers anys s'han realitzat estudis per avaluar la diversitat genètica entre patovars de *P. syringae* i entre aïllats d'un mateix patovar utilitzant diferents tècniques com proves bioquímiques (Gardan i col., 1990), electroforesi d'enzims i proteïnes (Denny i col., 1988; Van Zyl i Steyn, 1990; Some i Samson, 1991), anàlisi d'àcids grassos (Stead, 1992), serològiques (Ovod i col., 1995; Saunier i col., 1996) i moleculars (Denny i col., 1988; Young i col., 1996; Manceau i Horvais, 1997). Tot això porta a una constant revisió de la taxonomia dels bacteris fitopatògens i al canvi

de grup d'alguns patovars o fins i tot al canvi d'espècie. Alguns autors han proposat la divisió del patovar *P. syringae* pv. *syringae* en subgrups en funció de l'especificitat per l'hoste o altres caràcters (Denny i col. 1988, Gardan i col. 1990). Cal considerar també, que en ser un bacteri epífit hi ha aïllats de *P. syringae* procedents de plantes sanes, dels que no s'ha trobat un hoste específic, i aquests no s'han pogut incloure en cap patovar (al estar definits els patovars per l'especificitat per l'hoste) (Hirano i Upper, 1990).

### **3. Interacció *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* - planta**

#### **3.1. Aspectes epidemiològics**

*P. syringae* pv. *syringae* és una de les espècies bacterianes formadores de les comunitats microbianes de la superfície de les fulles (Hirano i Upper, 1994). És un bacteri que es pot trobar en grans quantitats en la superfície d'òrgans sans de la planta hoste i de plantes no hostes (fase epífita). Les poblacions epífites poden servir de reservori o ser la principal font d'inòcul per a la infecció de la planta hoste quan les condicions ambientals són òptimes i l'hoste està susceptible (Latorre i Jones, 1979; Wimalajeewa i Flett, 1985; Ross i Hattingh, 1986; Mansvelt i Hattingh, 1988; Hirano i col., 1995; Cazorla i col., 1997).

En perera, Mansvelt i Hattingh (1988) van observar que *P. syringae* pv. *syringae* té una fase resident en flors, fruits i fulles i van suggerir que aquesta fase podia ser la principal font d'inòcul per a la necrosi de flors a Sud-Àfrica. Whitesides i Spotts (1991) van detectar poblacions endòfites de *P. syringae* pv. *syringae* en l'interior de teixits sans de la tija i l'arrel d'arbres de perera, presentant, alguns dels aïllats, característiques patogèniques i activitat nucleadora de gel (INA). Aquesta població endòfita podria ser una font d'inòcul potencial important pel desenvolupament de la malaltia en perera.

Els nivells poblacionals de la fase epífita de *P. syringae* pv. *syringae* tenen una variació estacional. En general, la presència de nivells poblacionals elevats i unes condicions ambientals concretes són factor lligats a la malaltia provocada per *P. syringae* pv. *syringae* en l'hoste (Montesinos i Vilardell, 1991b; Cazorla i col., 1997). En fruiters de fulla caduca la població bacteriana fluctua al llarg de l'any, amb nivells més elevats en borrons i flors a la primavera (sobretot en primaveres fredes i humides), seguit d'una baixada de la població a l'estiu, per tornar a augmentar gradualment a la tardor. Els bacteris persisteixen en els borrons dormits des d'on colonitzen els teixits vegetals joves

en desenvolupament (Gross i col., 1983). En perera, els màxims nivells poblacionals s'observen també a la primavera i a la tardor coincidint amb condicions ambientals òptimes (temperatures baixes, humitats relatives elevades, pluges i boires) i màxima susceptibilitat dels òrgans de la planta hoste (Mansvelt i Hattingh, 1988). La multiplicació bacteriana i la manifestació dels símptomes estan lligats a temperatures d'entre 12-15°C, no superiors a 20 °C, essent les lesions de la planta la principal via de penetració del bacteri (Calzolari i col., 1992). A les comarques de Girona la dinàmica poblacional de *P. syringae* pv. *syringae* en perera presenta dos períodes de màxim creixement durant les períodes humits de primavera i tardor i un mínim creixement durant el període sec d'estiu (Montesinos i col., 1987). Durant la primavera, *P. syringae* pv. *syringae* es localitza majoritàriament en borrons florals, mentre que a la tardor es troba sobretot a les fulles.

La capacitat de *P. syringae* pv. *syringae* de provocar formació de nuclis de gel a temperatures poc inferiors a 0 °C (-5 a -1 °C) potencia el seu caràcter patogènic, ja que per una banda, en plantes sensibles als danys per gelada provoca danys per gelada, i per altra banda, les lesions dels teixits afavoreixen la infecció. Diversos autors suggereixen que els danys per gelada predisposen la planta a la infecció per *P. syringae* pv. *syringae* (Vigouroux, 1979; Lindow i col., 1982; Montesinos i Vilardell, 1991b). El fet que *P. syringae* pv. *syringae* generalment no infecti teixits vegetals sense ferides fa pensar que el bacteri ha desenvolupat la capacitat de predisposar els teixits vegetals al dany per gelada i permetre la seva subseqüent penetració per les microferides ocasionades per la gelada (Lindow, 1983). Tot i això, Cazorla i col. (1997) han observat que no és necessària la presència de ferida per a la penetració de *P. syringae* pv. *syringae* en mango, on una possible via d'entrada serien obertures naturals de la planta com les cavitats secretores de ceres.

Alguns autors han observat variacions estacionals en la susceptibilitat de l'hoste a *P. syringae* pv. *syringae*, essent les fulles i els fruits susceptibles a la primavera, quan són immadurs (Wimalajeewa, 1987). En general només els teixits joves i en creixement són susceptibles.

També s'han observat diferents nivells de susceptibilitat a *P. syringae* pv. *syringae* en funció de la varietat de l'espècie hoste. En presseguer es van observar diferents graus de susceptibilitat al patogen en funció de la varietat, en un experiment realitzat amb inoculacions artificials en condicions controlades (Werner i col., 1986). En perera s'han observat diferents nivells de malaltia en funció de la varietat en plantacions comercials (Vilardell, com. pers.), però no s'ha realitzat cap avaluació de la sensibilitat de diferents

varietats en condicions controlades i amb inoculacions artificials. També s'ha observat una especificitat per la varietat de l'espècie hoste en poblacions epífites de *P. syringae* pv. *syringae* en mongetera i cirerer (English i col., 1980).

### **3.2. Aspectes patogènics**

#### *Interacció bacteri-planta en la superfície de la planta*

Els bacteris epífits o residents poden sobreviure i fins i tot multiplicar-se en la superfície dels òrgans vegetals utilitzant nutrients orgànics i inorgànics que difonen fora dels teixits de la planta, sense ser reconeguts per la planta ni afectar el seu desenvolupament, ja que les cèl·lules bacterianes no es poden comunicar amb les cèl·lules epidèrmiques de la planta a través de la cutícula. Les cèl·lules bacterianes i les de la planta només interaccionen realment quan el bacteri es troba en l'espai intercel·lular o entra en el sistema vascular de l'hoste.

#### *Interacció bacteri-planta en l'espai intercel·lular*

Els bacteris no entren en contacte directe amb la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste, sinó amb la paret cel·lular. Tots els senyals entre el bacteri i les cèl·lules de la planta han de passar per la paret cel·lular. *P. syringae* pv. *syringae*, com la majoria dels bacteris fitopatògens que provoquen necrosis, es multiplica i colonitza l'espai intercel·lular de la planta hoste (Rudolph i col., 1989; Gopalan i He, 1996).

Els bacteris fitopatògens entren en contacte físic amb les cèl·lules de la planta tant en la reacció compatible com en la incompatible, adherint-se a la superfície cel·lular en l'espai intercel·lular, però la forma de contacte és diferent en les dues situacions. En la situació compatible (bacteri fitopatogen virulent-hoste susceptible) el bacteri es multiplica i colonitza l'espai intercel·lular. En la situació incompatible (bacteri patogen avirulent -hoste susceptible o bacteri patogen virulent-hoste resistent o no hoste) la cèl·lula bacteriana s'adhereix a la superfície de la paret cel·lular de les cèl·lules vegetals i la seva multiplicació queda restringida, en desenvolupar la planta la reacció d'hipersensibilitat (HR) que provoca necrosis localitzades al punt d'infecció i la mort ràpida del patogen. Aquesta reacció d'hipersensibilitat és un mecanisme de defensa general de les plantes en front dels patògens: virus, fongs i bacteris (Klement i Goodman, 1967a). En bacteris sapròfits la població bacteriana es pot mantenir en el temps però no es multiplica.

### 3.2.1. Mecanismes de la patogènia de *P. syringae* pv. *syringae* en cèl·lules vegetals

El desenvolupament de la malaltia en la planta hoste és l'expressió simultània dels productes gènics de la patogènia en el bacteri i la supressió dels gens de resistència en la planta. Aquesta combinació assegura la compatibilitat i les condicions per a la ràpida multiplicació i forta activitat metabòlica que permeti al bacteri colonitzar els teixits de la planta.

*P. syringae* pv. *syringae* té un conjunt de gens induïbles que s'expressen en determinades circumstàncies i poden jugar un paper important en la seva activitat patogènica. Entre aquests gens hi ha els de producció de pioverdines quelants de ferro, de producció d'exomucopolisacàrids (EPS) que faciliten l'emascament dels lipopolisacàrids que intervenen en el procés d'interacció amb l'hoste, de producció de fitotoxines necrotitzants com les siringomicines i de formació de proteïnes nucleadores de gel, entre altres (Gross i Cody, 1985). Tot i que no hi ha evidències que alguns d'aquests metabolits extracel·lulars estiguin implicats en la inicialització de la malaltia, sembla ser que contribueixen al síndrome de la malaltia (Goodman i Novacky, 1994).

#### *Producció de fitotoxines*

La major part de les soques virulentes de *P. syringae* pv. *syringae* produeixen siringomicina (SR) i/o siringotoxina (ST). Són toxines lipopeptídiques, hoste-inespecífiques i formadores de necrosis, d'elevada activitat fitotòxica i antibiòtica (Gross, 1991). La siringotoxina només és produïda per algunes soques fitopatògenes de cítrics. Les siringomicines són fitotoxines de baix pes molecular que intervenen en l'expressió dels símptomes de la malaltia causada pel bacteri. Els gens de producció de siringomicina (gens *syr*) corresponen a un agregat de gens del cromosoma bacterià d'aproximadament 7Kb (Zhang i col., 1995). Tamura i col. (1994) van observar que altres patovars de *P. syringae* també produeixen siringomicina.

Ziegler i col. (1994) van demostrar que les siringotoxines tenen capacitat de despolaritzar les membranes lipídiques en induir la formació de canals iònics en la membrana. De fet, l'estructura lipopeptídica d'aquestes toxines permet la seva inserció entre els lípids de la membrana plasmàtica de la cèl·lula vegetal, interferint en el transport d'ions a través del plasmalemma. Com a conseqüència es produeix una hiperpolarització de la membrana, una ràpida sortida de  $K^+$  i l'estimulació de la bomba de protons de l'ATPasa, sembla ser que per activació d'una proteïna-quinasa, provocant la fosforilació

de varies proteïnes incloent l'ATPasa. Aquests canvis en la membrana són similars als que es donen en la reacció hipersensible.

Sembla ser que la siringomicina intervé en el desenvolupament de la patogènia provocant la sortida de  $K^+$  de la cèl·lula vegetal, neutralitzant el pH àcid de l'espai intercel·lular, i creant així un ambient favorable per a la multiplicació bacteriana. A més, la interferència amb el transport actiu podria portar a l'acumulació de sacarosa, aminoàcids i ions orgànics en l'espai intercel·lular que el patogen utilitzaria com a nutrients (Gross, 1991). Es considera que la siringomicina aparentment accentua el procés de malaltia en provocar la mort de moltes cèl·lules de l'hoste durant la patogènesi (Gross, 1991).

Darrerament s'ha observat que les soques de *P. syringae* pv. *syringae* que produeixen SR i/o ST sintetitzen siringopeptines (Sps), uns lipopèptids amb activitat a nivell de la membrana plasmàtica de la cèl·lula vegetal similar a la de les siringomicines (Di-Giorgio i col., 1996).

Aquestes toxines a part de tenir acció fitotòxica, tenen acció biocida per varis microorganismes. Degut a això s'ha suggerit que l'activitat antimicrobiana de la siringomicina intervé en la protecció de *P. syringae* pv. *syringae*, o de forma més general, en la competència i supervivència del bacteri en condicions naturals (Iacobellis i col., 1992).

### ***Polisacàrids extracel·lulars (EPS)***

*P. syringae* pv. *syringae* sintetitza polisacàrids extracel·lulars (EPS) que li permeten absorbir aigua i mantenir un elevat contingut hídric en l'espai intercel·lular per poder sobreviure i colonitzar teixits (Rudolph i col., 1989, Goodman i Novacky, 1994). Això fa que els símptomes de les lesions en els llocs d'infecció siguin necrosis hidratades ('water soaked'). En absència de necrosis hidratades la patogènesi no es desenvolupa, fenomen interpretat per Rudolph i col. (1989) com un mecanisme de resistència. Es considera, per tant, que els EPS són factors de virulència dels bacteris fitopatògens, responsables dels símptomes de necrosi hidratada en els teixits infectats (Rudolph, 1994). Sembla ser que més del 5% del pes sec del total d'una planta de mongetera infectada per *P. syringae* pv. *phaseolicola* és EPS bacterià, que ocupa principalment l'espai intercel·lular. S'ha suggerit que les cèl·lules bacterianes no envoltades per EPS en entrar en contacte amb la paret cel·lular de la cèl·lula vegetal indueixen el fenomen d'hipersensibilitat (Goodman i Novacky, 1994).



### ***Producció de lipopolisacàrids (LPS)***

Tot i que els lipopolisacàrids són constituents de la membrana externa dels bacteris Gram negatius també s'han trobat en el medi extern al voltant dels bacteris. Sembla ser que són productes que intervenen en la patogènia i que són molt específics. S'han observat que mutants deficients en la cadena lateral O dels lipopolisacàrids de *P. syringae* pv. *syringae* no són fitopatògens ni capaços de créixer en l'espai intercel·lular (Rudolph, 1994).

### ***Producció de pioverdines***

*P. syringae* pv. *syringae* en condicions ambientals limitants de ferro produeix un sideròfor fluorescent anomenat pioverdina<sub>ps</sub> que té gran afinitat pel ferro i intervé en el seu transport. No sembla però, que l'excreció de pioverdina tingui un paper important en la patogènia i virulència del bacteri, ja que mutants no productors de pioverdina provoquen els mateixos símptomes i lesions que la soca natural (Cody i Gross, 1987). Tot i això aquestes substàncies poden ajudar a crear un microambient favorable per a la multiplicació del bacteri i colonització de l'espai intercel·lular en ser quelants de ferro (Rudolph, 1994).

### ***Capacitat de formar nuclis de gel***

*P. syringae* pv. *syringae* té capacitat iniciadora de nuclis de congelació de l'aigua a temperatures superiors (-5 a -1°C) a les que gelen petites quantitats d'aigua pura (-40°C). Aquesta característica està restringida a un petit nombre de bacteris associats a vegetals i, concretament soques de *P. syringae* pv. *syringae* són particularment actives en la formació de gel, juntament amb algunes soques d'*Erwinia herbicola* i de *P. fluorescens* (Lindow, 1983). La capacitat de formació de nuclis de gel de *P. syringae* pv. *syringae* és deguda a la presència d'una estructura proteica situada a la membrana externa de la paret cel·lular i està regulada per un gen situat en el cromosoma bacterià (Lindow, 1983; Zhang i col., 1995).

Està demostrat que la temperatura crítica d'entrada en gelada d'un òrgan està estretament correlacionat amb la quantitat de bacteris amb activitat nucleadora de gel que conté (Luisetti i Gaignard, 1985; Marshall, 1988; Itier i col., 1991). Panagopoulos i Crosse (1964) van observar que els borrons de perera gelen a temperatures d'entre -5 i -2°C. Si després de la gelada s'inoculen amb una suspensió de *P. syringae* pv. *syringae* la infecció és severa, mentre que si no hi ha gelada i s'inoculen la infecció és mínima. Montesinos i Vilardell (1991b) van observar que les temperatures mitjanes de nucleació

dels borrons florals durant la dormició hivernal oscil·laven entre -2.7 i -6.0 °C i depenien dels nivells poblacionals de *P. syringae*.

### **3.2.2. Canvis produïts en la planta per l'activitat patogènica de *P. syringae* pv. *syringae***

#### ***Canvis estructurals en la cèl·lula hoste***

En la inducció de la reacció hipersensible en plantes no hoste per part de *P. syringae*, a les poques hores de la interacció s'observa un debilitament de la paret cel·lular de la planta, la separació del plasmalemma de la paret cel·lular, vesiculació del plasmalemma i la formació d'agregats de microfibrilles i de vesícules lligades a la membrana en l'espai entre el plasmalemma i la cara interna de la paret cel·lular (Goodman i col., 1976; Politis i Goodman, 1978). La formació dels agregats en la paret cel·lular i les vesícules associades a la membrana indiquen una resposta activa de la cèl·lula hoste a l'entrada de bacteris incompatibles (Goodman i Novacky, 1994). En observacions realitzades al microscopi electrònic s'ha vist que no només la membrana plasmàtica queda alterada, sinó que també els cloroplasts i altres membranes subcel·lulars perden la seva organització. En canvi, en la reacció compatible la cèl·lula vegetal manté la seva estructura i organització durant un període més llarg de temps, tot i que al final acaba desorganitzant-se i morint com a resultat de la infecció per part del patogen (Goodman i Novacky, 1994).

#### ***Canvis en la permeabilitat cel·lular***

L'assumpció que els bacteris fitopatògens indueixen canvis en la permeabilitat de la cèl·lula hoste està àmpliament acceptada (Wheeler, 1975), però les evidències es limiten a pocs estudis (taula 2). Tant en la reacció compatible com en la incompatible es produeix un augment de la permeabilitat de les cèl·lules vegetals. En la reacció compatible un augment del tamany de les lesions va lligat a un augment de la permeabilitat a soluts (Williams i Keen, 1967).

En general, en la reacció compatible es produeix la sortida o acumulació de soluts als espais intercel·lulars que seran elements nutritius per a la cèl·lula bacteriana. Una de les primeres manifestacions en la reacció hipersensible és un augment de la sortida d'electròlits relacionada amb una pèrdua de la integritat estructural de la membrana cel·lular.

**Taula 2.** Treballs en els que s'han estudiat els canvis en la permeabilitat de la cèl·lula vegetal durant la interacció amb els bacteris fitopatògens *P. syringae* i *E. amylovora*

Bacteri	Planta hoste	Autors
<i>E. amylovora</i>	perera	Brisset, 1990; Brisset i col., 1994
<i>E. amylovora</i>	pomera	Burkowicz i Goodman, 1969; Brisset i Paulin, 1991; 1992
<i>E. amylovora</i>	tabac	Brisset i Paulin, 1991; 1992
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	cogombre	Williams i Keen, 1967
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	mongetera	Mobley i col., 1972; Brisset i col., 1994
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	mongetera	Atkinson i Baker, 1987; Brisset i col., 1994
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	tabac	Atkinson i col., 1985a; Brisset i col., 1994
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	pomera	Brisset i col., 1994
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	cotó	Pike i col., 1992

Atkinson i col. (1985b) van observar que el  $K^+$  és l'ió que més ràpidament es perd tant en la reacció compatible com en la incompatible, provocant l'alcalinització del medi extracel·lular i l'acidificació de l'interior de la cèl·lula. En el cas de la situació compatible la sortida de  $K^+$  de les cèl·lules vegetals es dona de forma més lenta i està fortament relacionada amb la multiplicació bacteriana i el desenvolupament dels símptomes.

Atkinson i col.(1990), en inocular *P. syringae* pv. *syringae* en cèl·lules de tabac (situació incompatible), van observar que durant les primeres hores de la reacció d'hipersensibilitat es produeix un augment de l'entrada de  $Ca^{2+}$  dins la cèl·lula vegetal, suggerint que l'entrada de  $Ca^{2+}$  forma part del desenvolupament de la resposta hipersensible i que un augment del flux de  $Ca^{2+}$  és un requeriment pel desenvolupament de la HR induïda per bacteris. Segons aquests autors, el calci intervindria en la inducció de la resposta hipersensible a través de la inducció de senyals moleculars per diverses vies, de forma similar als organismes animals, en que actuen fosfolipases dependents de calci.

### ***Peroxidació de lípids***

Els canvis estructurals en la membrana plasmàtica durant el desenvolupament de la reacció d'hipersensibilitat sembla ser que són deguts a la peroxidació de lípids per l'activitat de formes d'oxigen actiu com superòxid ( $O_2^-$ ) o hidroxil ( $OH^\cdot$ ), formats per reducció de l'oxigen, o bé per l'activitat de la lipooxigenasa. Adam i col. (1989) van observar un augment de la peroxidació de lípids causada per l'activitat de radicals d'oxigen actiu, en la reacció hipersensible induïda en inocular *P. syringae* pv. *syringae* en tabac. Aquest augment estava relacionat amb un augment de la sortida d'electròlits al cap de poques hores de la inoculació. L'oxigen actiu pot actuar, a part de sobre els lípids de la membrana, sobre els canals de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ -ATPasa i  $Ca^{2+}$ -ATPasa. Altres autors han observat un augment de l'activitat de la lipooxigenasa després de la inducció de la resposta hipersensible, mentre que en la situació compatible o en inocular un bacteri sapròfit no s'observen variacions en la concentració de l'enzim (Goodman i Novacky, 1994).

### **3.3.3. Regulació gènica de la patogènia de *P. syringae* pv. *syringae***

La compatibilitat i incompatibilitat entre els bacteris i les plantes estan sota el control d'un grup de gens bacterians. Els gens de la patogènia estan lligats als de la inducció de la hipersensibilitat en el grup de gens anomenat *hrp* (*hr*: hipersensibilitat i *p*: patogènia) (Lindgren i col., 1986). Fins al moment s'han descrit gens *hrp* en *P. solanacearum*, *P. syringae*, *X. campestris* i *E. amylovora* (Murillo i Rodríguez-Palenzuela, 1996). Un dels productes d'aquest grup de gens són les harpines, produïdes pels bacteris fitopatògens en el desenvolupament de la reacció hipersensible. *P. syringae* pv. *syringae* produeix una harpina formada per una proteïna extracel·lular rica en glicina, de 34.7 kD (He i col., 1993), codificada per un gen *hrpZ*. Les harpines són inductors de la reacció hipersensible, termoestables, hidrofíliques i sensibles a les proteases. Apostol i col. (1989) suggereixen que el primer pas de la inducció de la reacció hipersensible és la interacció de les harpines amb algun component específic de la membrana de la cèl·lula vegetal i això provoca un seguit d'alteracions en la membrana i finalment la mort cel·lular. En concret consideren que la interacció de l'harpina amb punts concrets de la membrana plasmàtica pot provocar la generació d'oxigen actiu i causar danys estructurals i alteracions funcionals a la cèl·lula vegetal. El paper de les harpines en la patogènia no està clar. He i col. (1993) apunten que realitzen funcions com excretar nutrients de la cèl·lula vegetal a l'apoplast.

Es coneixen 25 gens *hrp* en *P. syringae* que tenen com a mínim tres funcions bioquímiques: regulació gènica, secreció de proteïnes i producció de proteïnes inductores de la resposta hipersensible (Gopalan i He, 1996). Sembla ser que els gens *hrp* poden ser activats en resposta a productes de la planta hoste, com compostos fenòlics, que activen el gen *sy* B que controla la producció de siringomicina en *P. syringae* pv. *syringae*. En general es creu que els senyals de la planta (diverses molècules) juguen un paper important en la inducció dels gens *hrp* tant en la situació compatible com en la incompatible. Els factors ambientals també tenen un efecte important en l'activació dels gens. Rahmne i col. (1991) van demostrar que el grup de gens *hrp* està regulat per un sistema complex en el que hi intervenen factors físics, pH, condicions osmòtiques i repressió catabòlica. Els gens *hrp* a més, estan implicats en el transport extracel·lular de compostos bacterians (Murillo i Rodriguez-Palenzuela, 1996). Estudis recents indiquen que molts gens *hrp* de diversos bacteris fitopatògens necrogènics (*P. syringae*, *E. amylovora*, *P. solanacearum*, *X. campestris*) són homòlegs (Gopalan i He, 1996). A més, els gens *hrp* de bacteris fitopatògens són homòlegs als de patògens d'animals com *Yersinia* (Huang, i col., 1995; Preston i col., 1995).

Addicionalment als gens *hrp* hi ha els gens *avr* (gens de l'aviorulència) que juguen un paper important en l'expressió de la hipersensibilitat. Aquests gens són més específics i controlen l'expressió fenotípica de la hipersensibilitat, fent que el bacteri sigui virulent en unes varietats de l'espècie hoste i avirulent en altres (Keen, 1990). La funció que realitzen aquests gens és la de condicionar la virulència del patogen a un hoste susceptible, ja que alguns d'ells s'ha observat que interactuen amb els gens de resistència de la planta hoste, mitjançant una relació *gen a gen* (Innes, 1996). S'han identificat gens *avr* en *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas* spp. i *Xanthomonas* spp. En *P. syringae* s'han identificat i seqüenciat en els patovars *glicinea*, *tomato* i *phaseolicola* (Gopalan i He, 1996).

Els gens *hrp* i *avr* són dos tipus de gens diferents que no sembla que estiguin controlats per un mecanisme comú, tot i que els gens *avr* poden afectar l'expressió gènica o modificar l'activitat del producte gènica dels gens *hrp* (Gopalan i He, 1996).

**BACTERI****CÈL.LULA DE LA PLANTA****Inducció**

Alliberació de molècules de la superfície bacteriana

Inducció de gens bacterians

Síntesi i alliberació dels productes dels gens *hrp*Sortida de  $K^+$   
Canvi en el pH

Reconeixement

Ràpid ajust a l'estrès

Cèl.lules més receptives als gens *hrp*

Activació de proteïnes-quinases

Fitoalexines

Inducció de gens d'estrès no específics

Síntesi i alliberació dels productes dels gens d'estrès

1. Activació del sistema peroxidasa/ $H_2O_2$
2. Formació de radicals superòxid i hidroxil per l'activitat reductora del NADH/NADPH. Peroxidació de lípids.
3. Efecte en la regulació dels canals ATPasa i/o de  $K^+$  de la membrana plasmàtica.

**Post inducció**

(no són necessaris bacteris vius)

Efectes en la cèl.lula

Efectes en els teixits

Entrada de  $Ca^{2+}$ Fosforilació per quinases (activades pel  $Ca^{2+}$ )Activació  $H^+$ -ATPasa quinasaDespolarització membrana plasmàtica  
Sortida de  $K^+$ 

Pèrdua de la regulació cel.lular

Mort cel.lular

Pèrdua de turgència

Col.lapse dels teixits

**Figura 2.** Model de la reacció d'hipersensibilitat en plantes induïda per bacteris (Goodman i Novacky, 1994).

## 4. Mètodes de control de *P. syringae* pv. *syringae*

Les mesures de control de *P. syringae* són similars a les de control de la majoria de bacteriosis, basades en el coneixement de l'epidemiologia i patogènia del bacteri, el cicle de la malaltia i els factors que afecten el seu desenvolupament. El coneixement d'aquests aspectes permet utilitzar sistemes de control preventiu integrats, que tinguin en compte la sensibilitat i estat sanitari del material vegetal, la utilització de tècniques culturals de suport i un control químic racional. Per a realitzar un control químic racional és indispensable el coneixement dels mecanismes d'acció dels productes químics.

### 4.1. Selecció de varietats i material vegetal

La selecció i utilització de varietats resistents al patogen és una via important en el control de la malaltia. Per les diferents espècies vegetals en les que *P. syringae* pv. *syringae* és fitopatogen s'han realitzat alguns estudis de la susceptibilitat varietal (Werner i col., 1986). En perera s'han realitzat observacions a nivell de plantacions comercials del grau de susceptibilitat de les diferents varietats al patogen però, tot i que s'han posat a punt diferents tècniques per a l'avaluació de la patogenicitat de diferents soques de *P. syringae* pv. *syringae* en perera en condicions controlades (Yessad i col., 1992), no s'ha realitzat una àmplia avaluació de la sensibilitat de les principals varietats i portaempelts de perera.

El coneixement de la susceptibilitat varietal és interessant ja que varietats resistents o poc sensibles poden ser utilitzades en programes de selecció i millora varietal o bé, en cas de tenir les característiques agronòmiques per a una bona producció i expectatives comercials, poden substituir-ne d'altres susceptibles al patogen en zones on la malaltia sigui un problema important. La utilització de portaempelts resistents o poc sensibles al patogen pot ajudar a disminuir la incidència de la malaltia (Hayward, 1991).

Finalment, la utilització, en les noves plantacions, de material vegetal amb bon estat sanitari és molt important per evitar l'entrada del patogen.

## 4.2. Mesures culturals

Com a mesures de caire preventiu cal tenir en compte la situació de la plantació, evitant zones massa fredes, humides i sòls mal drenats (English i col., 1980; Luisetti i col., 1983; Luisetti i Gaignard, 1987). Cal prevenir també, les gelades de primavera, ja que les ferides són les principals vies de penetració del bacteri. El sistema de reg més adient és el gota a gota, un tipus de reg localitzat que no contribueix a l'augment de la humitat relativa ambiental com ho fa el reg per aspersió. Mantenir els arbres durant tot el període vegetatiu amb una nutrició completa i equilibrada també pot ajudar a obtenir nivells inferiors de malaltia (Luisetti i col., 1983). Com a mesures sanitàries, en realitzar la poda és convenient desinfectar tot el material de poda per evitar contaminar altres parts o material sa, i en cas d'observar material contaminat s'ha de tallar i incinerar (la planta o part de la planta afectada) per fer desaparèixer fonts d'inòcul de la plantació. Cal tenir en compte que la població de *P. syringae* pv. *syringae* endòfita pot ser una important font d'inòcul al podar (Whitesides i Spotts, 1991).

## 4.3. Control químic

El control químic de *P. syringae* pv. *syringae* es basa en l'aplicació preventiva de compostos cúprics i antibiòtics (estreptomicina, kasugamicina, en els països en que aquests estan permesos) (English i col., 1980; Luisetti i col., 1983; Jones i Aldwinckle, 1990; De Waard i col., 1993; Montesinos i López, 1996). La seva utilització però, està limitada per la baixa eficàcia, els problemes de fitotoxicitat en la planta o l'aparició de resistència en el patogen (Andersen i col., 1991; De Waard i col., 1993; Canals i Díaz, 1994; Spotts i Cervantes, 1995; Scheck, 1996). La capacitat de *P. syringae* pv. *syringae* d'existir com a fase endòfita permet al bacteri evitar el contacte directe amb qualsevol compost antimicrobià no sistèmic, com el coure, limitant així l'efectivitat d'aquest producte (Whitesides i Spotts, 1991).

El fosetil-Al, un producte sistèmic derivat del fosfonat, utilitzat en el control de malalties causades per fongs fitopatògens (*Phytophthora*, *Pythium*), ha estat avaluat en experiments de camp i d'hivernacle pel control de malalties causades pels bacteris *Erwinia chrysantemi*, *Pseudomonas cichori* i *Xanthomonas campestris* en plantes ornamentals (Chase, 1993), *X. arboricola* pv. *citri* en cítrics (McGuire, 1988), *E. amylovora* en perera i pomera (Paulin i col., 1990) i *P. syringae* pv. *syringae* en mango (Cazorla i col., 1997). En la majoria de casos s'ha mostrat eficaç o relativament eficaç en el control de la malaltia,



però amb resultats poc consistents. Chase (1993) va observar que l'eficàcia del producte en el control de *Xanthomonas campestris* en ornamentals varia en funció del pH, la cadència i el nombre d'aplicacions. Montesinos i Vilardell (1991a), en assajos realitzats en plantacions comercials de perera pel control de la necrosi de borrons de flor, van observar que les aplicacions de derivats cúprics i/o antibiòtics (kasugamicina) eren efectius, mentre que l'aplicació de fosetil-Al va mostrar una eficàcia moderada. Amb l'aplicació de fosetil-Al a la primavera, per polvorització foliar, es va aconseguir una reducció del 60% en la incidència de la malaltia l'any següent. Assajos posteriors han mostrat que altres productes derivats del fosfonat, com el fosfonat potàssic, també són efectius en el control de la necrosi de borrons de flor (Montesinos i Vilardell, 1996). Tot i això l'efectivitat d'aquests productes és variable, depenent del moment, la dosi i la cadència d'aplicació i de la varietat de perera.

La forma d'acció del fosetil-Al no es coneix massa bé. Ha estat estudiada principalment en el control de malalties fúngiques (Dolan i Coffey, 1988; Guest i Grant, 1991; Faretra i col., 1992; El-Hamalawi i Menge, 1994; El-Hamalawi i col., 1995). És un producte sistèmic, que sembla ser que intervé directament en la interacció hoste-patogen, bé activant les reaccions de defensa de l'hoste, bé estimulant el fong fitopatogen per a que intensifiqui els fenòmens de reconeixement, provocant la incompatibilitat (Bompeix, 1989). El mecanisme d'actuació d'aquest producte en el control de malalties bacterianes no es coneix.

#### 4.4. Control biològic

El control biològic consisteix en emprar microorganismes antagonistes del patogen, que poden utilitzar diferents mecanismes d'actuació com la competència, el parasitisme, o bé microorganismes que desenvolupin la reacció hipersensible en la planta, induint la resistència sistèmica.

En el control per competició s'utilitzen bacteris sapròfits, majoritàriament de les espècies *Pseudomonas fluorescens* i *Erwinia herbicola*, que es mostren antagonistes de *P. syringae* pv. *syringae* en la planta. La capacitat antagonista de diferents soques de *P. fluorescens* i *E. herbicola* en front *P. syringae* pv. *syringae* ha estat avaluada *in vitro* (Bonaterra, 1995) i *in vivo* (Lindow i col., 1996). Lindow i col. (1996) van realitzar assajos de camp utilitzant una soca de *P. fluorescens* resistent a l'estreptomicina i l'oxitetraciclina pel control del foc bacterià (*E. amylovora*) i els danys per gelada causats

per *P. syringae* pv. *syringae* en perera. Van observar que la població de *P. fluorescens* es mantenia en nivells elevats i detectables després de la inoculació, i que reduïa la incidència de les dues malalties en un 40-50% respecte controls no tractats.

També s'ha avaluat la capacitat de control de la malaltia amb soques de *P. syringae* pv. *syringae* mutants no patogèniques (avirulentes, INA<sup>-</sup>). La infecció per part de mutants no virulents de *P. syringae* pot induir la resistència en la planta en front de la infecció per una soca virulenta de *P. syringae* (Kessman i col., 1994). Lindow (1987) utilitzant una soca epífita mutant INA<sup>-</sup> de *P. syringae* va aconseguir reduir els danys per gelada produïts per *P. syringae* pv. *syringae* en perera. Aquesta soca mutant INA<sup>-</sup> va mostrar bona capacitat de colonització de les fulles, flors i fruits immadurs de perera en experiments de camp i va reduir la colonització dels teixits per *P. syringae* i *E. amylovora*.

Tot i això, el control biològic en general, i en concret el control biològic de *P. syringae* pv. *syringae*, està en fase d'experimentació i no ofereix expectatives de ser utilitzat a escala productiva a curt termini, principalment per la dificultat de mantenir nivells suficients de les poblacions antagonistes sobre la planta en els períodes de risc d'infecció.

#### 4.5. Perspectives del control

La poca eficàcia dels productes químics convencionals pel control de *P. syringae* pv. *syringae* en perera, juntament amb la problemàtica de la utilització de compostos químics (toxicitat, aparició de resistències en el patogen, residus), fa que es tendeixi a sistemes de control integrats en els que s'incloguin pràctiques culturals, utilització de varietats resistents i control biològic (encara en fase d'experimentació), juntament amb un control químic racional.

En el control químic actualment es tendeix a la substitució de bactericides convencionals, que actuen directament sobre el patogen (*antimicrobians de primera i segona generació*) com els derivats de coure i antibiòtics, per productes que puguin actuar a nivell de la interacció hoste-patogen, modificant la fisiologia de l'hoste i induint la resistència sistèmica. Aquests productes són els anomenats *antimicrobians de tercera generació*, si addicionalment tenen activitat antimicrobiana directa, i els *antimicrobians de quarta generació*, si no presenten activitat antimicrobiana. La utilització d'aquests tipus de productes pot contribuir a millorar la qualitat ambiental en el control químic de malalties

(De Waard i col., 1993). El fosetil-Al i altres derivats del fosfonat s'inclourien en aquest grup de productes en estimular mecanismes de defensa en la planta (Bompeix, 1989; De Waard i col., 1993).

Per a la utilització del fosetil-Al, i altres derivats del fosfonat, en el control químic racional de *P. syringae* pv. *syringae* en perera cal conèixer la forma d'actuació dels productes sobre el patogen, en la planta i en la interacció hoste-patogen. Per això és necessari el desenvolupament de metodologies que permetin estudiar la forma d'acció d'aquests productes en el control de la infecció del patogen en la planta, i a la vegada la seva activitat en la interacció hoste-patogen.

Per avançar en l'experimentació del control de bacteriosis és necessari treballar en condicions i material vegetal el més semblant a les condicions de producció a camp, però els resultats obtinguts en aquest experiments sovint són aleatoris ja que hi intervenen factors no controlables. A més en els cultius d'espècies llenyoses les experimentacions són llargues en el temps. En condicions de laboratori els resultats que s'obtenen de vegades no es corresponen amb els de camp, i això fa que l'experimentació avanci lentament. És interessant desenvolupar metodologies o sistemes d'estudi de l'activitat dels productes químics estandarditzables, repetibles i de fàcil manipulació, que controlin factors que no siguin objecte d'estudi i permetin, d'aquesta manera, entendre el comportament de la planta i el patogen (per separat o la interacció) davant els productes.

## OBJECTIUS GENERALS

L'objectiu principal del treball que es presenta ha estat estudiar l'activitat de derivats del fosfonat en el control químic de *P. syringae* pv. *syringae* en perera. Per a això s'han proposat els següents objectius concrets:

En primer lloc, desenvolupar models de laboratori en els que intervinguin l'hoste i el patogen i permetin estudiar diferents aspectes de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera, determinant els factors que afecten la interacció.

En segon lloc avaluar l'activitat de diferents fosfonats en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera, determinant l'efecte d'aquests compostos en el bacteri, en la planta i en la interacció bacteri-planta.

# CAPÍTOL 1

## DESENVOLUPAMENT DE SISTEMES MODEL I METODOLOGIES PER A L'ESTUDI DE LA INTERACCIÓ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* -PERERA

---

### INTRODUCCIÓ

#### 1. Factors que afecten la interacció

Per al desenvolupament de la malaltia, la planta i el patogen han d'entrar en contacte i interaccionar. Per a que es produeixi la interacció i la infecció dels teixits vegetals per part del patogen cal, a més, que les condicions ambientals siguin favorables. Els tres components (planta, patogen i factors ambientals) poden tenir una variabilitat considerable, i el canvi en un dels tres components pot afectar la severitat de la malaltia. Pel que fa a l'hoste, el desenvolupament de la malaltia o la inducció de la reacció d'hipersensibilitat (HR) depenen de que la varietat sigui més o menys sensible o resistent al patogen i de l'estat fenològic (teixits joves o madurs). En quant al patogen, aquest pot ser més o menys virulent en funció de l'aïllat i de la dosi (nombre de bacteris presents en el moment d'iniciar la infecció). Les condicions ambientals poden afectar tant el creixement i la resistència de la planta hoste com la taxa de creixement del patogen i el desenvolupament d'infeccions. La interacció dels tres components s'ha representat en l'anomenat *triangle de la malaltia* (Agrios,1997), segons el qual només que un dels tres factors no sigui favorable, no es produeix la malaltia.

Per desenvolupar models o sistemes d'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera, estandarditzables, repetibles i aplicables a l'estudi de l'activitat de productes químics en la interacció, és necessari conèixer com afecten els tres elements del triangle de la malaltia (hoste, patogen i factors ambientals). D'aquesta manera es podran

utilitzar les combinacions hoste (varietat i estat fenològic), patogen (virulència i dosi) i condicions ambientals, adients pels aspectes de la interacció que es vulguin estudiar.

És important, per tant, el coneixement de la sensibilitat o resistència de diferents varietats de perera a *P. syringae* pv. *syringae* i de la virulència de diferents aïllats del patogen, així com l'efecte de l'edat de l'òrgan de la planta i de la concentració del patogen en la severitat de la malaltia.

El desenvolupament de la malaltia o la inducció de la reacció hipersensible en la planta estan relacionats amb les condicions ambientals durant la interacció bacteri-planta. Klement i col. (1987) van observar que el manteniment de plantes de mongetera en foscor abans i després de la inoculació amb *P. syringae* pv. *phaseolicola* (reacció compatible) provocava el desenvolupament de necrosis seques típiques de la reacció hipersensible, en lloc de necrosis hidratades característiques de la malaltia. Cal conèixer per tant, l'efecte dels factors ambientals en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera i en el desenvolupament dels símptomes.

## 2. Metodologies per a l'estudi de la interacció

Els estudis de patogènia realitzats en condicions de camp tenen limitacions pel fet que el material vegetal presenta un cert grau d'heterogeneïtat, els factors ambientals no són controlables, i la distribució del patogen no és uniforme, en estar format per poblacions heterogènies i sotmès a equilibris amb la resta de poblacions microbianes. Això fa que aquests estudis es realitzin en condicions de laboratori, en les que a més de controlar els factors ambientals, es pot treballar amb quantitats suficients de material vegetal, homogeni i de fàcil manipulació.

Una de les tècniques més utilitzades per a l'avaluació de la patogenicitat i virulència de *P. syringae* pv. *syringae* en perera és la inoculació de fruits immadurs (Billing i col., 1960; Gross i col., 1984). Amb aquesta tècnica s'aconsegueix treballar amb material vegetal de tamany reduït i uniforme, encara que provinent de camp. Té l'inconvenient però, que el material vegetal només és disponible durant un període curt de temps a l'any. Yessad i col. (1992) van desenvolupar un tècnica per a l'avaluació de la virulència i patogenicitat de *P. syringae* pv. *syringae* en perera basada en la inoculació, en condicions controlades, de fulles separades de la planta. Amb aquesta tècnica s'aconsegueix reduir encara més les necessitats de material vegetal i té l'avantatge que les

fulles són disponibles durant un període més llarg de temps en els arbres, i durant tot l'any en plantes mantingudes en hivernacle (obtingudes a partir de llavor o per micropropagació). Cal tenir en compte però, que en les inoculacions artificials els símptomes poden ser diferents dels observats a camp en condicions naturals. En les inoculacions artificials de *P. syringae* pv. *syringae* en perera cal realitzar ferida per obtenir infeccions i observar símptomes (Yessad i col., 1992). Això pot modificar l'expressió dels símptomes i la severitat de la malaltia, respecte les infeccions naturals. Per això, és important la utilització de diferents tècniques i la comparació dels resultats obtinguts.

Per a realitzar un seguiment en el temps de la resposta de la planta o del patogen en la interacció, és aconsellable utilitzar plantes senceres, ja que la planta sencera té capacitat per desenvolupar mecanismes de defensa que parts separades de la planta (fulles, fruits) no tenen (Shaw i Kado, 1988). Brisset (1990) va desenvolupar una tècnica d'inoculació de microplàntules no arrelades de perera obtingudes *in vitro*, per estudiar la patogenicitat d'*Erwinia amylovora*. Aquesta tècnica va permetre diferenciar entre varietats resistents i varietats sensibles al patogen i entre soques del patogen virulentes i soques no virulentes, però no es van diferenciar nivells de sensibilitat en les plantes o de virulència en les soques.

Per a estudiar l'evolució en el temps de determinats aspectes de la interacció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera, com el desenvolupament i severitat de la malaltia, i la multiplicació bacteriana en els teixits de la planta, és necessari, posar a punt una tècnica d'inoculació artificial del bacteri en perera, utilitzant la planta sencera. Aquesta tècnica ha de permetre obtenir resultats reproduïbles, fer un seguiment clar del desenvolupament de la malaltia i poder inocular, de forma fàcil i ràpida, gran quantitat de material vegetal. Caldrà identificar els símptomes corresponents a la infecció del patogen (reacció compatible) i a la reacció hipersensible, i diferenciar-los. També s'hauran de determinar les concentracions d'inòcul i l'estat fisiològic del material vegetal adients per observar símptomes del desenvolupament de les dues respostes (compatible i incompatible) en la planta. Si la tècnica permet estudiar de forma clara diferents aspectes de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera podrà ser utilitzada per a avaluar l'activitat de derivats del fosfonat en la interacció.

Les plantes de perera obtingudes per micropropagació poden ser un material vegetal adient tant per les inoculacions en fulles separades de la planta (estudis de sensibilitat varietal i patogenicitat del bacteri), com per inoculacions en la planta sencera

(estudis del desenvolupament de la malaltia o la reacció hipersensible, i seguiment de la població bacteriana durant la interacció), ja que es pot aconseguir material genèticament homogeni en condicions ambientals controlables, de tamany reduït i de fàcil manipulació. Una de les limitacions d'aquest tipus de material vegetal és el fet que l'obtenció de microcultius només ha estat possible en algunes varietats de perera (Brisset, 1990).

Com s'ha comentat en la introducció general, un esdeveniment lligat tant a la patogènia com a la reacció d'hipersensibilitat és l'augment de la permeabilitat de la membrana plasmàtica de la cèl·lula vegetal durant la interacció amb el bacteri. Aquest fenomen és anterior al desenvolupament dels símptomes visibles en la planta. Diversos autors han relacionat aquest fenomen amb el desenvolupament de la reacció hipersensible (Klement i Goodman, 1967a; Atkinson i col., 1985a; Atkinson i col., 1985b; Atkinson i Baker, 1987), o amb el desenvolupament de la malaltia (Addy, 1976), en inocular bacteris fitopatògens en diverses espècies vegetals. Altres han intentat establir la relació entre l'augment de permeabilitat i la intensitat de la malaltia en inocular bacteris fitopatògens en el seu hoste (Burkowicz i Goodman, 1969; Addy, 1976; Brisset, 1990; Brisset i Paulin, 1991).

S'han desenvolupat diferents metodologies per mesurar la sortida d'electròlits de les cèl·lules vegetals durant la interacció amb bacteris fitopatògens (Klement i Goodman, 1967b; Atkinson i col., 1985a). Les condicions ambientals (il·luminació, humitat relativa) poden afectar la permeabilitat dels teixit vegetals inoculats (Cook, 1973; Goodman, 1972). L'edat de la fulla i la concentració d'inòcul infiltrada també poden afectar la sortida d'electròlits de la cèl·lula vegetal durant la interacció (Burkowicz i Goodman, 1969; Goodman, 1972; Cook, 1975). Brisset (1990) va posar a punt una metodologia per mesurar els canvis de permeabilitat en la cèl·lula vegetal en perera durant la interacció amb *E. amylovora*, utilitzant discs de fulles de plantes de perera infiltrats amb suspensions bacterianes. Aquesta metodologia ha estat aplicada a l'estudi de la relació de la sortida d'electròlits en perera amb la virulència d'*E. amylovora* (Brisset i Paulin, 1991) i de les interaccions entre bacteris necrogènics i les plantes (Brisset i col., 1994).

L'aplicació de la tècnica desenvolupada per Brisset (1990) a l'estudi dels canvis de permeabilitat en perera en inocular *P. syringae* pv. *syringae* o en el desenvolupament de la reacció hipersensible, així com la relació entre l'augment de permeabilitat i la virulència del patògen, permetrà establir models de resposta de la perera en funció de la sensibilitat o resistència al patògen. Aquests models podran ser utilitzats per estudiar l'efecte dels derivats del fosfonat en la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera.

### 3. Aplicació de les metodologies desenvolupades a l'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera

La determinació de l'efecte de l'hoste, el patogen i les condicions ambientals en el desenvolupament i severitat de la malaltia, juntament amb la posada a punt de tècniques d'inoculació del patogen en la planta i de metodologies d'estudi de diferents aspectes de la interacció, permetran definir models d'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae* - perera. Aquests models consistiran en les combinacions hoste (varietat, estat fenològic), patogen (soca, dosi), condicions ambientals i metodologia més adients per estudiar cada un dels aspectes de la interacció. Pensant en la posterior aplicació dels models a la determinació de l'efecte de derivats del fosfonat en la interacció *P. syringae* pv *syringae*-perera, s'ha considerat interessant estudiar els següents aspectes de la interacció:

En primer lloc, el desenvolupament de símptomes macroscòpics i microscòpics en les situacions compatible i incompatible, relacionant-los amb el desenvolupament de la malaltia en la interacció compatible i de la resposta hipersensible en la incompatible, i amb els canvis estructurals en els teixits de la planta durant la interacció.

Un altre aspecte de la interacció interessant d'estudiar, és la multiplicació del bacteri en l'espai intercel·lular dels teixits de fulla de perera, ja que l'augment de la població bacteriana depèn de la compatibilitat hoste-patogen. En la combinació compatible sol produir-se un augment de la població en varis ordres de magnitud durant els primers dies de la interacció, mentre que en la combinació incompatible, la població bacteriana pot augmentar a l'inici, però després s'atura, no assolint els nivells poblacionals de la relació compatible (Goodman i Novacky, 1994).

En tercer lloc, determinar la pauta de sortida d'electròlits de les cèl·lules de perera inoculades amb *P. syringae* en funció de la interacció compatible/incompatible i de la virulència del patogen. Intentant establir la relació entre la virulència del patogen i la resistència de la planta, i la sortida d'electròlits, de forma similar a la definida per perera-*E. amylovora* (Brisset i Paulin, 1991).

El coneixement dels canvis estructurals en els teixits de la fulla de perera, la multiplicació bacteriana en l'espai intercel·lular i els canvis de permeabilitat de la cèl·lula vegetal, durant la interacció, tant en la situació compatible com en la incompatible, serà útil per entendre l'activitat dels derivats del fosfonat en el control de *P. syringae* pv. *syringae* en perera.



## OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest capítol ha estat desenvolupar models d'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera que puguin ser aplicats a la determinació de l'efecte de derivats del fosfonat en la interacció. Per a això ha estat necessari:

(1) Determinar l'efecte de factors ambientals (temperatura), l'hoste (sensibilitat varietal) i el patogen (virulència) en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera.

(2) Desenvolupar una metodologia que permeti l'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae* -perera en la planta sencera.

(3) Estudiar aspectes de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera relacionats amb la multiplicació bacteriana, els canvis estructurals dels teixits de l'hoste i els canvis en la permeabilitat de la cèl·lula vegetal durant el desenvolupament de la malaltia i de la resposta hipersensible.

## MATERIAL I MÈTODES

### 1. Efecte de l'edat de la fulla i de la temperatura d'incubació en la infecció

#### 1.1. Material vegetal

Es van utilitzar fulles de plantes de perera (*Pyrus communis*) de la varietat Conference clonades i autoarrelades, clon CAV (Agromillora Catalana S.A., Barcelona), obtingudes per micropropagació. Les plantes, de 3 anys, tenien un únic brot d'aproximadament 1 m d'alçada i es trobaven en contenidor de plàstic de 20 cm de diàmetre. Les plantes es van forçar a brotar 2 mesos abans de l'experiment per obtenir brots joves i en creixement actiu. Durant la brotació es van mantenir en hivernacle i es van fertilitzar setmanalment amb una solució de 200 ppm de N-P-K (20-10-20).

En la determinació de l'efecte de la temperatura les inoculacions es van realitzar sobre fulles joves, corresponents a les fulles més tendres de la brotació de l'any (primera i segona fulles del brot tendre). En la determinació de l'efecte de l'edat de la fulla es van utilitzar fulles de dos edats diferents: fulles joves, formades sobre el brot de l'any (últimes fulles del brot tendre) i fulles formades sobre brots de més d'un any (fulles basals de la planta).

En els dos experiments les fulles es van recollir el mateix dia en que es van realitzar les inoculacions i van ser guardades dins bosses de plàstic a 4 °C fins la inoculació.

#### 1.2. Inòcul

Es van utilitzar les soques EPS94 i EPSLL3Y de *P. syringae* pv. *syringae* aïllades de teixits necrosats de perera (la procedència i característiques de les soques s'indiquen a la Taula 1.2).

Es van preparar suspensions d' $1-5 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> en aigua destil·lada estèril a partir de cultius purs de les soques crescuts durant 24 h a 25 °C en agar B de King (King i col., 1954). Les suspensions es van preparar el mateix dia en que es van realitzar les

inoculacions i es van mantenir a 4 °C fins al moment d'inocular. Per comprovar la concentració de les suspensions es van fer dilucions 1:10 de cada suspensió i es van sembrar 50 µl de les dilucions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  i  $10^{-7}$  en agar B de King. Les plaques sembrades es van col·locar durant 48 hores a 25 °C i es va fer el recompte de les colònies de cada placa.

### **1.3. Inoculacions i incubació**

Abans de realitzar les inoculacions es van desinfectar les fulles submergint-les durant 20 segons en una solució d'hipoclorit sòdic comercial (0.5 % clor actiu). A continuació es van fer tres rentats amb aigua destil·lada estèril i es van eixugar sobre paper de filtre estèril en la campana de flux laminar.

Les fulles es van col·locar dins plaques Petri quadrades de 12 cm de costat que contenien una base d'agar sòlid estèril (15 g d'agar en 1 l aigua destil·lada) i paper de filtre estèril a sobre per assegurar la humitat en les fulles durant el procés d'incubació. La inoculació es va realitzar segons la tècnica descrita per Yessad i col. (1992) fent una ferida en el nervi principal de la fulla, a 1/3 de la base, amb un bisturí i dipositant 20 µl de la suspensió bacteriana en la ferida (Figura 1.1).

Les plaques amb les fulles inoculades es van precintat amb Parafilm i es van col·locar durant 48 hores a 25 °C, 16 h llum i 18°C, 8 h fosc i humitat relativa superior al 90%, en l'experiment per determinar l'efecte de l'edat de la fulla. En l'experiment per determinar l'efecte de la temperatura les condicions de temperatura utilitzades van ser: 15, 20, 25 i 30°C. En els dos experiments es va utilitzar una cambra de temperatura, humitat relativa i fotoperíode controlats (model PGR15, Conviron, Winnipeg, Manitoba, Canadà).

### **1.4. Avaluació de la infecció**

A les de 48 hores de les inoculacions es va avaluar la presència o absència d'infecció i la seva severitat per cada una de les fulles. Els símptomes d'infecció corresponien a l'aparició de necrosi a partir del punt d'inoculació estenent-se pels nervis i la superfície de la fulla. Per avaluar la severitat de la infecció es van establir els següents índexs de severitat (*Is*):

**Taula 1.1.** Índexs de severitat utilitzats per avaluar la intensitat de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles de perera separades de la planta

<u>Índex de severitat</u>	<u>Símptomes</u>
0	Absència de símptomes
1	Necrosi localitzada en el punt d'inoculació
2	Necrosi del nervi principal de la fulla
3	Necrosi del nervi principal, secundaris, i/o una part de la superfície foliar
4	Necrosi de més del 50 % de la superfície foliar

A partir dels índexs de severitat de cada fulla ( $I_s$ ) es va calcular la severitat de la infecció ( $S$ ) per cada repetició utilitzant la següent fórmula:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n I_s i}{n \times 4} \times 100$$

on:  $I_s$ : Índex de severitat de la infecció per cada fulla ( $i$ )  
 $n$ : Nombre de fulles per repetició en cada tractament  
 4: Valor màxim de l'índex de severitat

### 1.5. Disseny experimental i anàlisi estadística

En els dos experiments es va realitzar un disseny experimental factorial totalment aleatoritzat de dos factors (soca de patogen i temperatura, i soca de patogen i edat de la fulla, respectivament), amb dos nivells per la soca, quatre nivells per la temperatura i dos nivells per l'edat de la fulla. Com a control es van inocular fulles amb aigua destil·lada estèril. Cada tractament va constar de 3 repeticions de 3 fulles.

L'homogeneïtat de les variàncies de la severitat de la infecció dels diferents tractaments es va comprovar amb la prova de Bartlett i la distribució normal dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk. L'efecte de cada factor en la severitat de la malaltia es va avaluar mitjançant l'anàlisi de la variància (ANOVA). L'efecte dels diferents nivells d'un factor es va determinar amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ). Els tractaments estadístics es van realitzar amb el paquet d'aplicacions estadístiques JMP per Macintosh (JMP 2.0, SAS Institute Inc.).

## 2. Sensibilitat de varietats europees de perera a *P. syringae* pv. *syringae* i virulència de diferents aïllats del bacteri

Per a la determinació de la sensibilitat de diferents varietats europees de perera a *P. syringae* pv. *syringae* i la virulència de diferents aïllats del bacteri, es van realitzar inoculacions en dos tipus de material vegetal: fruits immadurs i fulles joves. Tant les inoculacions en fruits immadurs com les inoculacions en fulles joves es van realitzar l'any 1993, durant el mes de maig, període en que les pereres estaven brotant i els fruits estaven quallant per la majoria de varietats.

### 2.1 Material vegetal

Es van utilitzar fruits immadurs de 25 varietats europees de perera i fulles joves de 45 varietats de la col·lecció de varietats de l'Estació Experimental Agrícola de la Fundació Mas Badia (Canet de La Tallada, Baix Empordà, Girona).

Les varietats utilitzades en les inoculacions en fulles joves van ser: Abate Fétel<sup>1</sup>, Alexandrine<sup>2</sup>, Beurre Anjou<sup>2</sup>, Beurre Hardy<sup>2</sup>, Beurre Hardent Point<sup>2</sup>, Blanquilla<sup>2</sup> (clon COSEL 840T), Bonne Louise<sup>2</sup>, Conference<sup>3</sup> (clon INFEL 415A), Devoe<sup>4</sup>, Doyenne du Comice<sup>2</sup>, El Dorado<sup>2</sup>, Épine du Mas<sup>2</sup>, Flor d'Hivern<sup>2</sup>, General Leclerc<sup>2</sup>, Grand Champion<sup>2</sup>, Guyot Precoç<sup>5</sup>, Highland<sup>2</sup>, Kaiser<sup>2</sup>, Magness<sup>2</sup>, Maxine<sup>2</sup>, Morettini, Packam's Triumph<sup>2</sup>, Passe Crassane<sup>2</sup>, Pierre Corneille<sup>2</sup>, President Drouard<sup>2</sup>, President Héron<sup>2</sup>, Red Rogne<sup>2</sup>, Rocha<sup>2</sup>, Rogue Red<sup>2</sup>, Star<sup>2</sup>, Starking<sup>6</sup>, Super Comice<sup>5</sup>, Williams<sup>4</sup> (clon INFEL 415A) i Winter Nellis<sup>2</sup>, i els perers autòctons<sup>7</sup>: MB-6 (Pera Vermella), MB-7 (Pera Xata), MB-11 (Petita de Sant Joan), MB-12 (Perer de Sant Jaume), MB-14 (Perer Bord), MB-19, MB-20, MB-21 (Pera Verda), MB-22 (Cuixeta), i MB-25 (Set en boca). Addicionalment es van inocular fulles del portaempelt OHF333 (franc híbrid: Old Home x Farmingdale).

---

Procedència de les varietats en la Col·lecció de Varietats de Perera de l'Estació Experimental Agrícola de la Fundació Mas Badia

<sup>1</sup> I.A.S.M.A. (Istituto Agrario di San Michele all Adige). Trento. Itàlia

<sup>2</sup> S.I.A. (Servicio de Investigación Agraria de la D.G.A.). Montañana. Espanya

<sup>3</sup> D.L. (SA Davodeau Ligonnere). Angers. France

<sup>4</sup> CERTIPLANT. Mollerussa. Espanya

<sup>5</sup> D (Pépinières et Roserales Georges DELBARD). Malicorne. France

<sup>6</sup> P.A.C.A. (Station d'Expérimentation Arboricole P.A.C.A.). Mallemort. France

<sup>7</sup> M.B. (Estació Experimental Agrícola Fundació Mas Badia). Canet de La Tallada. Espanya

En les inoculacions en fruits immadurs es van utilitzar les varietats Abate Fétel, Alexandrine, Beurre Anjou, Beurre Hardy, Conference, Devoe, Doyenne du Comice, El Dorado, Ercolini, General Leclerc, Grand Champion, Guyot Precoç, Jules Guyot, Kaiser, Magness, Morettini, Packam's Triumph, Passe Crassane, Pierre Corneille, President Heron, Rocha, Star, Super Comice, Williams, i la varietat autòctona: MB-6 (Pera Vermella).

Les diferents varietats tenien uns 10 anys, estaven empeltades sobre codonyer BA29 (*Cydonia oblonga*) i es trobaven en la mateixa plantació, per tant, havien estat sota les mateixes condicions climàtiques i havien tingut els mateix sistema de poda, reg, adobat i tractaments fitosanitaris. Els fruits es van recollir en el mateix estadi de desenvolupament (15 dies després del quallat) per totes les varietats, i es van guardar en fred (4 °C) fins al moment de les inoculacions. Tots els fruits es van inocular a la vegada. Les inoculacions en fulles es van realitzar sobre les més joves dels brots de l'any (primera i segona fulles del brot tendre). Les fulles es van recollir el mateix dia en que es van realitzar les inoculacions i van ser transportades fins al laboratori dins bosses de plàstic i en nevera per evitar una excessiva transpiració. En el laboratori es van guardar a 4 °C fins la inoculació.

## 2.2. Inòcul

Es van utilitzar 7 soques de *P. syringae* pv. *syringae* de diferent procedència (Taula 1.2). Les soques utilitzades van ser EPSMV4, EPS94, EPSLL3Y, EPS17a, 2027.37, 1392 i S8. Aquestes soques es van escollir d'entre soques de *P. syringae* pv. *syringae* aïllades de plantes de Girona, Lleida, França i Regne Unit. Es van escollir soques que diferissin en alguns caràcters bioquímics (Taula 1.3) i que procedissin de material vegetal i zona geogràfica diferents (Taula 1.2). Totes les soques havien estat identificades com a *P. syringae* pv. *syringae* segons l'esquema de Lelliott i col. (1966) per la identificació de pseudomonats fluorescents fitopatògens (Montesinos, no publicat).

### 2.2.1. Obtenció de cultius del bacteri en medi sòlid

Les soques utilitzades estaven conservades en forma de liofilitzat. Abans de començar les inoculacions es van resuspendre en 2 ml de brou B de King (King i col., 1954) i es van incubar a 25 °C durant 24 hores. Els cultius es van sembrar per estria en

## Capítol 1

agar B de King i es van fer créixer a 25 °C durant 24 hores. Els cultius purs obtinguts es van guardar a 4 °C. Aquests cultius van ser utilitzats per preparar l'inòcul en cada experiment.

**Taula 1.2.** Procedència de les soques de *P. syringae* pv. *syringae* utilitzades en les inoculacions

<i>Soca</i>	<i>Data aïllament</i>	<i>Zona geogràfica aïllament</i>	<i>Hoste</i>	<i>Òrgan o teixit</i>
EPSMV4 <sup>a</sup>	maig 1990	Girona	<i>Pyrus communis</i> (General Leclerc)	necrosi de flor
EPS94 <sup>a</sup>	abril 1987	Girona	<i>Pyrus communis</i>	necrosi de pistil
EPSLL3Y <sup>a</sup>	octubre 1987	Lleida	<i>Pyrus communis</i> (Conference)	necrosi de borrons
EPS17a <sup>a</sup>	gener 1987	Girona	<i>Pyrus communis</i>	borrons sans
2027.37 <sup>b</sup> (3077)	1983	França	<i>Pyrus communis</i>	fulla
1392 <sup>b</sup>	1950	Regne Unit	<i>Syringa vulgaris</i>	lesions
S8 <sup>c</sup>	d <sup>d</sup>	Regne Unit	<i>Pyrus communis</i>	d <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Col·lecció de soques de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA, Universitat de Girona)  
<sup>b</sup> Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (INRA Angers, France). Entre parèntesi s'indica la nova referència de la soca a la CFBP, ja que s'ha inclòs a la col·lecció l'any 1997  
<sup>c</sup> Col·lecció de l'East Malling Research Station ( Maidstone, Kent, Anglaterra)  
<sup>d</sup> d: desconegut

### 2.2.2. Obtenció de suspensions

Es van preparar suspensions d' $1-5 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> just abans de fer les inoculacions. Es van resuspendre en aigua destil·lada estèril colònies dels cultius purs de cada soca crescuts durant 24 h a 25 °C en agar B de King (King i col., 1954) i es van mantenir en la nevera a 4 °C fins al moment de la inoculació.

Per ajustar la concentració de les suspensions a  $1-5 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> es va utilitzar un espectrofotòmetre. En assajos previs s'havia determinat que una concentració de  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> de *P. syringae* pv. *syringae* corresponia a una absorbància de 0.2 a una longitud d'ona de 600 nm. Per comprovar la concentració de les suspensions que es van inocular es van fer dilucions 1:10 de les suspensions i es van sembrar 50 µl de les dilucions  $10^{-4}$ ,

**Taula 1.3.** Principals característiques bioquímiques de les soques de *P. syringae* pv. *syringae* utilitzades (Gardan, L.; Manceau, C.; Montesinos, E., dades no publicades)

Prova	Soca						
	EPS17a	EPSLL3Y	2027.37	EPS94	EPSMV4	S8	1392
Levans	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat a N <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+
Benzoat	-	-	-	-	-	-	-
D-Cel·lobiosa	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
Trealosa	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+
L-Tartrat	-	-	-	-	-	-	-
D-Tartrat	+	-	-	-	-	-	-
D-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-
L-Aspartat	+	+	+	+	+	+	+
2-Cetoglutarat	-	-	+	-	-	+	+
Malonat	-	-	+	-	-	-	-
N-Caproat	-	+	+	-	-	+	+
Piruvat	-	-	-	+	-	-	-
DL-5aminobutirat	-	-	+	-	-	+	+
Glicina	-	-	-	-	-	-	-
L-Cisteïna	-	+	-	-	-	-	-
L-Leucina	+	+	+	+	-	+	-
Sarcosina	-	-	+	-	-	+	-
Glucosamina	+	-	+	-	-	+	+
Hipersensibilitat en tabac	+	+	+	+	+	+	+
DNAsa	+	+	+	-	+	+	-

10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> i 10<sup>-7</sup> en agar B de King estèril (King i col., 1954). Les plaques es van col·locar 48 hores a 25 °C i es va fer el recompte de les colònies de cada placa.

### 2.3. Inoculacions i incubació

Abans de realitzar les inoculacions es va desinfectar el material vegetal submergint-lo durant 20 segons, en el cas de les fulles, i 5 minuts, en el cas dels fruits, en una solució d'hipoclorit sòdic comercial (0.5 % clor actiu). A continuació es van fer tres rentats amb aigua destil·lada estèril i es van deixar eixugar sobre paper de filtre estèril en la campana de flux laminar.



### ***Inoculacions en fulles separades de la planta***

Les fulles, desinfectades i deixades eixugar en la campana de flux, es van col·locar dins plaques Petri quadrades de 12 cm de costat que contenien una base d'agar sòlid estèril (15 g d'agar en 1 l d'aigua destil·lada) i paper de filtre estèril a sobre, per assegurar la humitat durant el procés d'incubació. La inoculació es va realitzar segons la tècnica descrita per Yessad i col. (1992) (veure apartat 1.3) dipositant 20 µl de la suspensió bacteriana en una ferida realitzada en la fulla (Figura 1.1). Les plaques amb les fulles inoculades es van precintat amb Parafilm i es van incubar a 25°C, 16 h llum i 18°C, 8 h fosc durant 48 hores en una cambra d'ambient controlat (model PGR15, Conviron, Winnipeg, Manitoba, Canadà).

### ***Inoculacions en fruits immadurs***

Les inoculacions es van realitzar mitjançant ferida, impregnant la punta d'una agulla emmanegada estèril amb els cultius bacterians en medi sòlid i punxant amb l'agulla la superfície del fruit (Figura 1.2). A cada fruit s'hi van realitzar tres inoculacions amb la mateixa soca de *P. syringae* pv. *syringae*. Es va realitzar un control punxant fruits de cada varietat amb l'agulla emmanegada estèril sense passar pel cultiu bacterià. Com a referència es van inocular fruits amb un bacteri sapròfit, *P. fluorescens* EPSB4, aïllat de borrons de perera de plantacions de Girona, procedent de l'INTEA-UdG. Els fruits inoculats es van col·locar sobre una gradeta dins una safata amb aigua destil·lada, de manera que el peduncle del fruit passés pel forat de la gradeta i quedés en contacte amb la superfície de l'aigua, evitant així la seva deshidratació. Les safates amb els fruits es van posar dins bosses de plàstic transparent, humitejades amb aigua estèril per la seva cara interna i es van tancar hermèticament. A continuació es van incubar durant 4 dies a 25°C, 16 hores llum i 18 °C, 8 hores fosc en una cambra de temperatura controlada (model Hotcold, Selecta, Espanya).

## **2.4. Avaluació de la infecció**

Passat el període d'incubació (48 hores en el cas de les fulles i 4 dies en el cas dels fruits) es va avaluar la presència d'infeccions i la seva severitat per cada una de les inoculacions realitzades en les fulles o fruits. En les fulles els símptomes, en cas d'haver-hi infecció, corresponien a necrosis iniciades en el punt d'inoculació que avançaven pel nervi principal i, segons la severitat, s'estenien pels altres nervis i pel limbe de la fulla.

En els fruits, els símptomes d'infecció eren necrosis al voltant del punt d'inoculació, estenent-se per la superfície del fruit. Per avaluar la severitat de les infeccions es van establir uns índexs de severitat (*Is*) diferents segons es tractés de fulles o de fruits (Taula 1.4).

**Taula 1.4.** Índexs de severitat (*Is*) utilitzats per avaluar la intensitat de la infecció de diferents soques de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles i fruits de varietats de perera

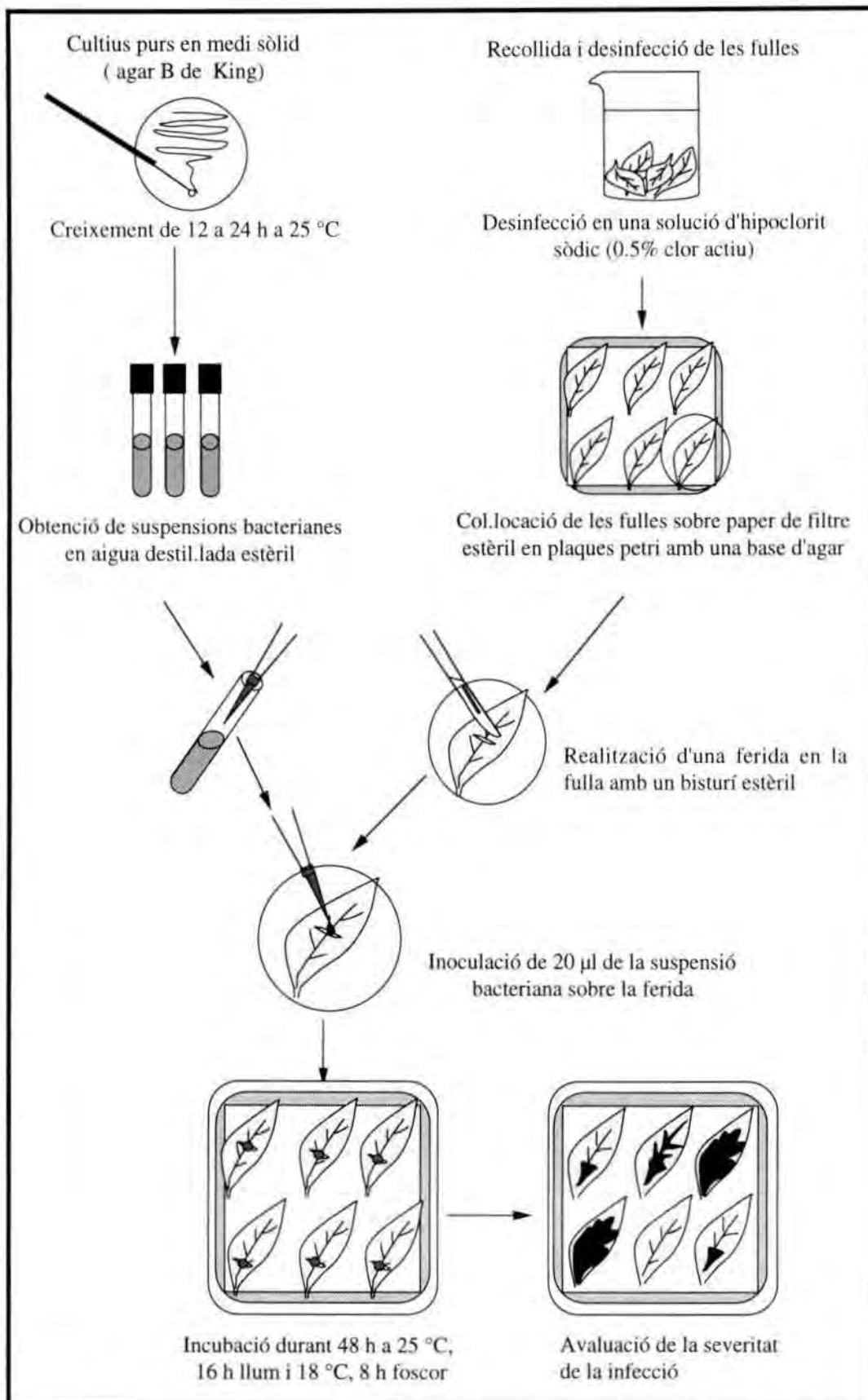
<i>Is</i>	<i>Símptomes</i>	
	Fruits	Fulles
0	Absència de símptomes	Absència de símptomes
1	Necrosi localitzada al punt d'inoculació.	Necrosi localitzada al punt d'inoculació
2	Necrosi inferior a 5 mm de diàmetre	Necrosi del nervi principal de la fulla
3	Necrosi de 5 a 10 mm de diàmetre	Necrosi del nervi principal, secundaris, i/o una part de la superfície foliar
4	Necrosi superior a 10 mm de diàmetre	Necrosi de més del 50 % de la superfície foliar

## 2.5. Disseny experimental

Tant en les inoculacions en fruits com en fulles es va realitzar un disseny experimental factorial totalment aleatoritzat amb dos factors (soca de patogen i varietat de perera). Les varietats de perera i soques del patogen avaluades van ser diferents en funció del tipus d'inoculació.

### *Inoculacions en fruits immadurs*

En la determinació de la sensibilitat varietal a *P. syringae* pv. *syringae* es van inocular 25 varietats de perera (apartat 2.1) amb 2 soques del bacteri (EPS17a i 2027.37). En la determinació de la virulència d'aïllats del bacteri es van inocular 7 soques del patogen (Taula 1.2) en 4 varietats de perera (Conference, Passe Crassane, Rocha i Williams). Com a control es van inocular fruits de les diferents varietats amb aigua destil·lada estèril i amb el bacteri sapròfit *P. fluorescens* EPSB4. El disseny experimental va consistir en 9 fruits per tractament amb tres inoculacions per fruit.



**Figura 1.1.** Procediment per a la inoculació de *P. syringae* pv. *syringae* i l'avaluació de la infecció en fulles de perera separades de la planta.

### ***Inoculacions en fulles***

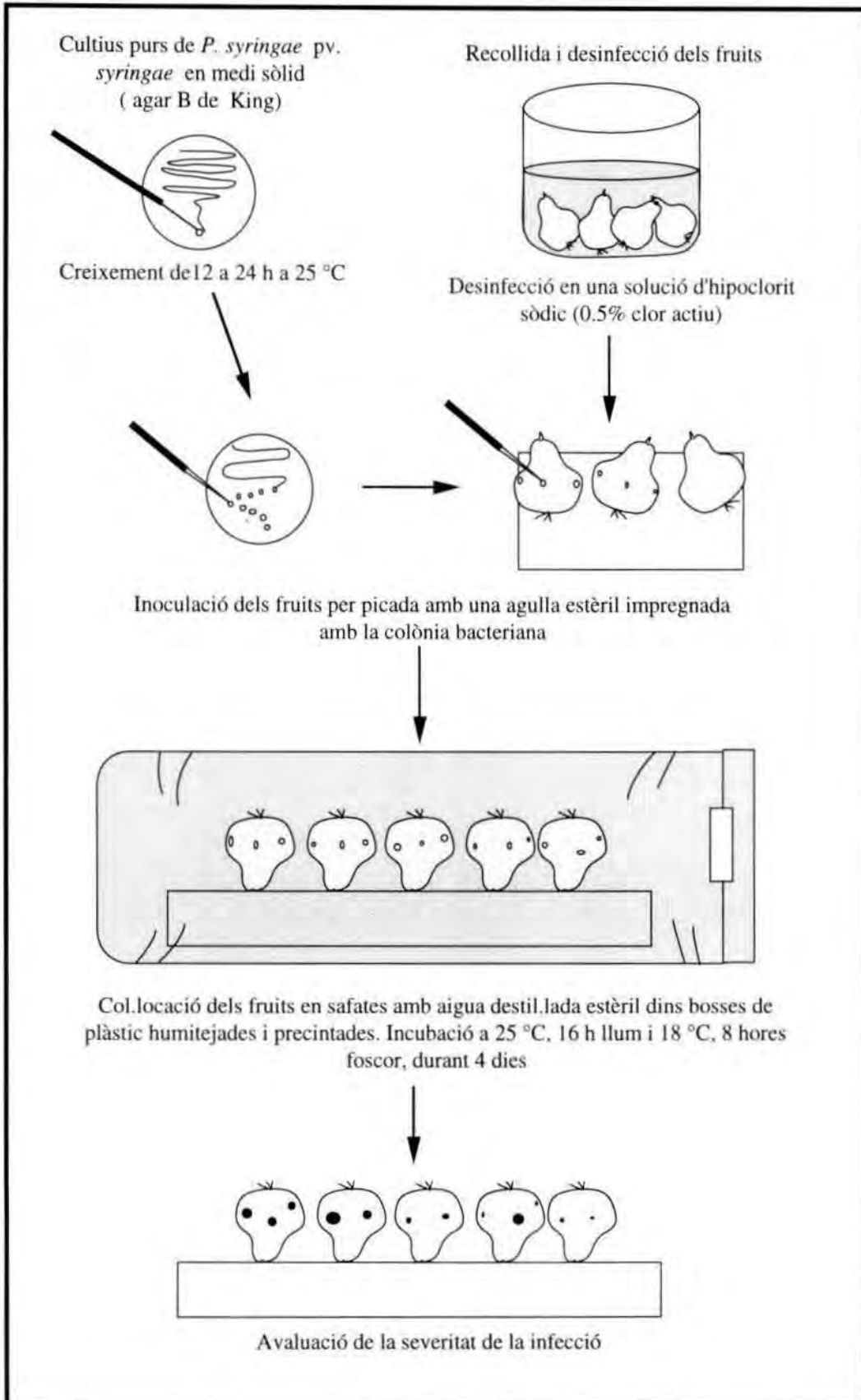
La sensibilitat varietal a *P. syringae* pv. *syringae* i la virulència d'aïllats del patogen es van determinar en un experiment combinat en el que es van inocular 45 varietats europees de perera (apartat 2.1) amb 7 soques de *P. syringae* pv. *syringae* (Taula 1.2). Com a control es van inocular fulles de cada varietat amb aigua destil·lada estèril. Es van inocular també fulles de les varietats Conference, Passe Crassane i Abate Fétel amb el bacteri sapròfit *P. fluorescens* EPSB4. Cada tractament va consistir en un total de 9 fulles.

### **2.6. Anàlisi estadística**

Per cada tractament es va obtenir la freqüència de cada un dels índexs de severitat (*I<sub>s</sub>*). Per cada experiment, aquestes freqüències es van representar en taules de contingència pels diferents factors i nivells. A partir d'aquestes freqüències es va realitzar l'anàlisi estadística per determinar l'efecte de la varietat de perera i la soca de patogen en la severitat de la infecció, utilitzant el mètode d'anàlisi de dades categòriques de màxima versemblança (Sokal i Rohlf, 1981; Fienberg, 1994). Aquest mètode permet ajustar les freqüències observades acumulades a un model lineal que segueix una funció logística. Permet avaluar l'ajust de les freqüències observades a les esperades (bondat d'ajust) i determinar l'efecte dels factors en el model (de forma similar a l'anàlisi de la variància en variables quantitatives).

Amb aquest mètode es van obtenir models loglineals per relacionar l'índex de severitat amb la varietat de perera i/o soca de patogen. La bondat d'ajust de cada model es va avaluar amb la prova de la relació de versemblança utilitzant l'estadístic  $\chi^2$  (chi quadrat) (Sokal i Rohlf, 1981; Fienberg, 1994). En cas d'obtenir models amb bon ajust ( $(P > \chi^2) < 0.05$ ) es va determinar l'efecte dels diferents factors (varietat, soca i interacció varietat-soca) en la severitat de la malaltia amb la prova de  $\chi^2$ .

Les anàlisis estadístiques es van realitzar amb el paquet d'aplicacions JMP per Macintosh (JMP 2.0, SAS Institute Inc.).



**Figura 1.2.** Procediment utilitzat en les inoculacions de *P. syringae* pv. *syringae* en fruits immadurs de pera.

### 3. Desenvolupament d'una metodologia per a l'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae* - perera en planta

Es va posar a punt una tècnica per a la inoculació del patogen en fulles de perera sobre la mateixa planta, permetent així la incubació de la planta sencera. Es va determinar l'efecte de la concentració d'inòcul i de l'edat de la fulla (o posició de la fulla en la planta) en el desenvolupament i la severitat de les infeccions.

#### 3.1. Efecte de la dosi de patogen i de l'edat de la fulla en la severitat

##### 3.1.1. Material vegetal

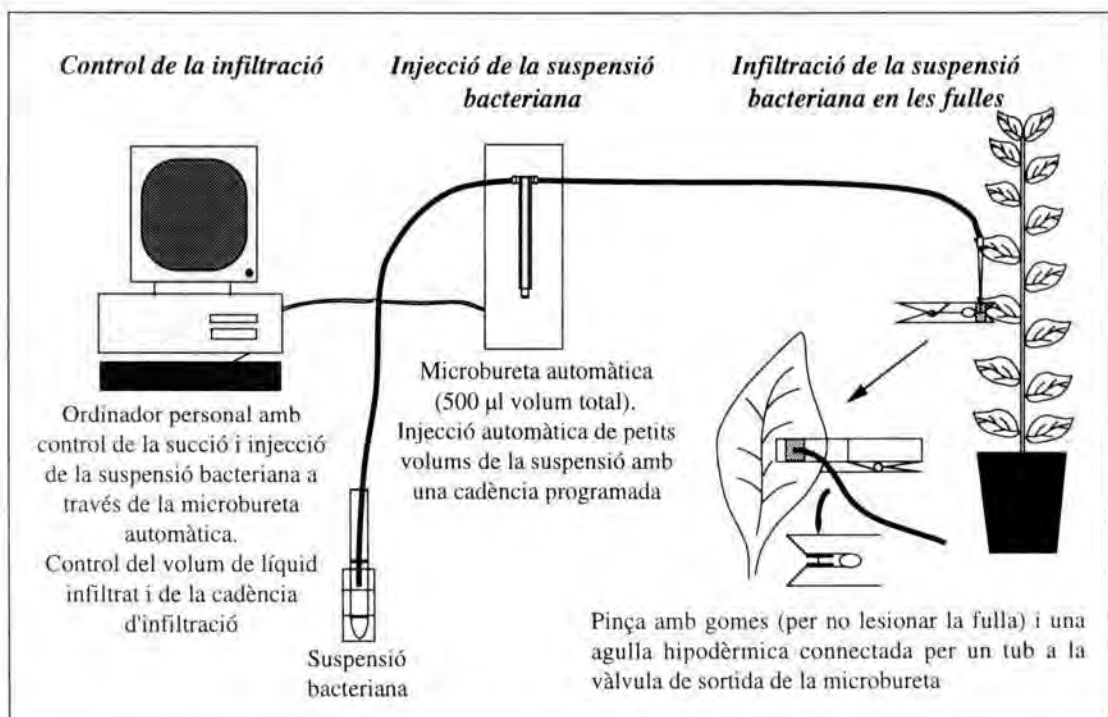
Es van utilitzar plantes de perera (*Pyrus communis*) de la varietat Conference clonades i autoarrelades, clon CAV (Agromillora Catalana S.A., Barcelona), obtingudes per micropropagació. Les plantes eren homogènies i havien estat forçades a brotar entre 15 dies i 1 mes abans de les inoculacions, per obtenir brots en creixement actiu. Aquestes plantes tenien les mateixes característiques que les utilitzades en els assajos anteriors (apartat 1.1 pàg. 29).

##### 3.1.2. Inòcul

Es va utilitzar la soca EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* (Taula 1.2). Es van obtenir suspensions d' $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, en aigua destil·lada estèril a partir de cultius purs crescuts durant 24 h a 25 °C en agar B de King (King i col., 1954). Les concentracions de les suspensions es van ajustar amb un espectrofotòmetre tenint en compte que  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> correspon a una absorbància de 0.2 a una longitud d'ona de 600 nm. Per comprovar la concentració es van fer dilucions 1:10 de les suspensions i es van sembrar 50 µl de les dilucions que donessin entre 30 i 300 ufc en plaques amb agar B de King (King i col., 1954). Les plaques es van col·locar a 25 °C durant 48 hores i posteriorment es va fer el recompte de colònies.

### 3.1.3. Inoculacions i incubació de les plantes

Les inoculacions es van realitzar en les fulles per microinfiltració localitzada de 50 µl de la suspensió bacteriana amb una agulla hipodèrmica estèril connectada a una microbureta automàtica (microBU2031, Crison Instruments S.A., Espanya). La microbureta tenia una capacitat de 500 µl de volum, i era controlada per ordinador de manera que la injecció, i el buidat i omplert de la bureta amb les suspensions bacterianes es feien automàticament. L'agulla hipodèrmica estava adaptada a unes pinces dotades per la cara interior d'una superfície de goma. L'agulla travessava des de l'exterior la goma d'un dels dos costats. Per inocular el patogen es posava la fulla entre la pinça i es feia pressió sobre la fulla amb les superfícies de goma per no lesionar-la. D'aquesta manera, la fulla es punxava amb l'agulla i la pressió de les pinces sobre els dos costats de la fulla al voltant del punt d'inoculació forçava la suspensió bacteriana a penetrar en l'espai intercel·lular del mesofil·le de la fulla. Es feia coincidir la pressió de les pinces amb la injecció de líquid de la microbureta. D'aquesta manera s'agilitaven les inoculacions i s'estandarditzava la tècnica (Figura 1.3). El control de la microbureta es va realitzar mitjançant un programa en BASIC modificat a partir d'un programa utilitzat per realitzar valoracions en química analítica (de La Torre, com. pers.).



**Figura 1.3.** Esquema dels components de l'aparell utilitzat per a la microinfiltració de suspensions bacterianes en fulles de plantes de perera.

Per a la determinació de l'efecte de la concentració de patogen en la severitat de la malaltia es van inocular totes les fulles de la planta. En cada fulla es van inocular 4 dosis amb dues repeticions per dosi, de manera que en dues fulles situades a un mateix nivell hi hagués inoculades les 8 dosis de patogen. Com a control es van inocular plantes amb aigua destil·lada estèril. Addicionalment es van inocular tres plantes amb el bacteri sapròfit *P. fluorescens* EPSB4 a la concentració d' $1.5 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>.

Per a la determinació de l'efecte de l'edat de la fulla en la severitat de la malaltia es van inocular totes les fulles de cada planta amb suspensions d' $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> del patogen. En cada fulla es van inocular les tres dosis amb dues repeticions per dosi (una a cada costat del nervi principal). Com a control es van inocular plantes amb aigua destil·lada estèril.

Les plantes inoculades es van incubar durant 5 dies en una cambra d'ambient controlat (model PGR15, Conviron, Winnipeg, Manitoba, Canadà) a 25°C, 16 hores llum i 18 °C, 8 hores fosc, i humitat relativa del 70-80%. Durant la incubació les plantes es van regar amb aigua destil·lada.

#### 3.1.4. Avaluació de la severitat de la malaltia

En cada una de les inoculacions realitzades es va avaluar la presència de símptomes i la severitat de la infecció als 5 dies de la incubació de les plantes. La presència d'infeccions corresponia a l'aparició de necrosi al voltant del punt d'inoculació. En funció de la severitat es van establir quatre índexs de severitat (*Is*) (Taula 1.5).

**Taula 1.5.** Descripció dels índexs de severitat utilitzats per avaluar la intensitat de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles en plantes de perera inoculades per microinfiltració localitzada

<b>Índex de severitat (<i>Is</i>)</b>	<b>Símptomes</b>
0	Absència de necrosi
1	Necrosi localitzada al punt d'inoculació
2	Necrosi al voltant del punt d'inoculació, bloquejada i sovint limitada per una regió cloròtica
3	Necrosi progressiva a partir del punt d'inoculació



La severitat de la malaltia per planta ( $S_p$ ) o la severitat de la infecció per fulla ( $S_f$ ) es van calcular a partir dels índexs de severitat amb les fórmules que s'indiquen a continuació. Per diferenciar conceptualment el desenvolupament d'infeccions i de la malaltia en la planta sencera o en cada una de les fulles, es va considerar adient utilitzar la terminologia *severitat de la malaltia* en fer referència a la severitat en la planta sencera i *severitat de la infecció* en referir-nos a la severitat en òrgans de la planta (en aquest cas fulles).

La severitat de la infecció per fulla es va calcular amb la següent fórmula:

$$S_f = \frac{\sum_{i=1}^n I_s i}{n \times 3} \times 100$$

on :  $S_f$ : Severitat de la infecció per fulla  
 $n$ : Nombre d'inoculacions per fulla  
 $i$ : Inoculació en la fulla  
 $I_s$ : Índex de severitat de la inoculació

La severitat de la malaltia per planta es va calcular amb la fórmula:

$$S_p = \frac{\sum_{j=1}^N I_s j}{N \times 3} \times 100$$

on:  $S_p$ : Severitat de la malaltia per planta  
 $N$ : Nombre d'inoculacions per planta  
 $j$ : Inoculació en la planta  
 $I_s$ : Índex de severitat de la inoculació

Per a la determinació de l'efecte de l'edat de la fulla (o la posició de la fulla en la planta) es va utilitzar la severitat de la infecció per fulla i per a la determinació de l'efecte de la dosi de patogen es va utilitzar la severitat de la malaltia per planta.

### 3.1.5. Disseny experimental

Es va realitzar un disseny factorial totalment a l'atzar. Cada tractament va constar de tres repeticions amb tres plantes per repetició.

### 3.1.6. Anàlisi estadística

En tots els experiments es va comprovar l'homogeneïtat de les variàncies dels valors de severitat dels diferents tractaments, utilitzant la prova de Bartlett, i la distribució normal dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk.

L'efecte de la dosi de patògen en la severitat de la malaltia es va determinar mitjançant una anàlisi de la covariància (ANCOVA) en considerar la dosi de patògen com a variable contínua. L'efecte de l'edat de la fulla en la severitat de la infecció es va determinar mitjançant una anàlisi de la covariància incloent la dosi de patògen com a covariable.

Els tractaments estadístics es van realitzar amb el paquet d'aplicacions estadístiques JMP per Macintosh (JMP 2.0, SAS Institute Inc.).

### **3.2. Cinètica de la multiplicació de *P. syringae* en perera**

Es va estudiar la multiplicació de *P. syringae* en l'espai intercel·lular de fulles de perera en la situació compatible i en la incompatible.

#### **3.2.1. Material vegetal**

Es van utilitzar plantes de perera de la varietat Conference autoarrelades i clonades (clon CAV) obtingudes per micropropagació (Agromillora Catalana, S.A., Barcelona). Aquestes plantes tenien 2 anys, un sol brot d'uns 40 cm d'alçada i estaven en contenidors de plàstic d'1 l. Les característiques de creixement i manteniment de les plantes van ser similars a les utilitzades en els assajos anteriors (aparats 1.1 i 3.1.1).

#### **3.2.2. Inòcul**

Es van utilitzar les soques EPS94 i SD68. La soca *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 és patògena en perera, virulenta i desenvolupa la reacció compatible en ser inoculada en una varietat sensible de perera (veure Taula 1.2). La soca *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 és patògena i virulenta en mongetera (*Phaseolus vulgaris*), no patògena en perera, i desenvolupa la reacció incompatible en ser inoculada en perera. Aquesta soca procedia de la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP, INRA Angers, France). Es van preparar suspensions d' $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> en aigua destil·lada estèril a partir de cultius purs de cada soca, crescuts durant 24 h a 25°C en agar B de King (King i col., 1954). L'ajust i comprovació de la concentració de les suspensions es va realitzar com s'ha descrit anteriorment (apartat 3.1.2 pàg. 41).

### **3.2.3. Inoculació i incubació de les plantes**

Les inoculacions es van realitzar per microinfiltració localitzada en les fulles mitjançant la tècnica descrita a l'apartat 3.1.3 (pàg. 42), inoculant totes les fulles de cada planta. En una mateixa fulla es van realitzar dues inoculacions amb cada una de les dosis d'inòcul. Com a control es van inocular plantes amb aigua destil·lada estèril.

Les plantes inoculades es van incubar durant 5 dies en una cambra d'ambient controlat (model PGR15, Conviron, Winnipeg, Manitoba, Canadà) a 25 °C, 16 h llum i 18°C, 8 h fosc, i humitat relativa del 70-80%. Durant la incubació les plantes es van regar amb aigua destil·lada.

### **3.2.4. Avaluació de la supervivència i multiplicació bacteriana en les plantes de perera inoculades**

El recompte de bacteris de les soques inoculades (ufc mm<sup>-2</sup> fulla) es va realitzar a les 0, 24 i 48 h de les inoculacions. Es van agafar 6 discs de 4 mm<sup>2</sup> de superfície del voltant del punt d'inoculació per cada tractament i repetició i es van homogeneïtzar amb un Politron (Politron PT 3000, Kinematica) en 5 ml d'aigua destil·lada estèril durant 5 minuts a 10000 rpm. Es van fer dilucions 1:10 de cada mostra i es van sembrar 20 µl de les dilucions 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> i 10<sup>-4</sup> en agar B de King. Les plaques es van incubar 48 h a 25°C i es va fer el recompte de colònies de cada soca.

### **3.2.5. Disseny experimental**

Es va realitzar un disseny factorial totalment aleatoritzat amb tres factors (soca, dosi de patogen i temps), dos nivells per la soca i la dosi de patogen, i tres nivells pel temps. Cada tractament va constar de tres repeticions de tres plantes.

### **3.2.6. Anàlisi estadística**

L'homogeneïtat de les variàncies del nivell poblacional de bacteris dels diferents tractaments es va comprovar amb la prova de Bartlett. La distribució normal dels residus es va avaluar amb la prova de Shapiro-Wilk.

L'efecte dels diferents factors i les interaccions en la multiplicació bacteriana es va determinar mitjançant una anàlisi de la covariància (ANCOVA). Es va utilitzar com a variable dependent la mitjana del nombre de bacteris viables per  $\text{mm}^2$  de fulla (transformats en  $\text{Log}_{10}$ ) de les tres repeticions de cada tractament, la soca de patògen com a variable independent i el temps i la dosi de patògen com a covariables.

### **3.3. Desenvolupament de símptomes i canvis estructurals en els teixits de fulla de perera durant la interacció**

Es va realitzar un seguiment visual de l'aparició dels símptomes i infeccions, al llarg de la incubació, en les fulles de les plantes inoculades, i es van observar els canvis estructurals en els teixits de les fulles. Per a això, a les 48 hores de la inoculació es van agafar discs foliaris de 0.5 cm de diàmetre de la zona infiltrada amb cada bacteri a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  i es van processar per a l'observació al microscopi òptic i als microscopis electrònics de rastreig i de transmissió. Per cada tractament es van agafar 6 discs de fulla. El processament de les mostres per a l'observació als microscopis electrònics va ser realitzat pel Servei de Microscòpia de la Universitat de Girona. L'observació també es va realitzar amb els microscopis del Servei.

Per a l'observació al microscopi electrònic de rastreig les mostres es van fixar en glutaraldehyd al 2.5% en tampó cacodilat 0.1 M, a continuació es van deshidratar amb una sèrie alcohòlica i es van assecar mitjançant la tècnica del punt crític amb  $\text{CO}_2$  (Emitech K950). Les mostres es van muntar amb plata col·loïdal i es van recobrir amb or (Emitech K550). L'observació es va realitzar amb un microscopi electrònic Zeiss DSM 960A de 3.5 nm de resolució i a 30KV de voltatge d'acceleració.

Per a l'observació al microscopi electrònic de transmissió les mostres es van fixar amb glutaraldehyd 2.5% en tampó cacodilat 0.1M pH 7.1, durant 4 hores. La postfixació es va realitzar amb tetraòxid d'osmi 1% en tampó cacodilat 0.1M durant 2 hores, i la deshidratació mitjançant una sèrie gradual d'acetona. Les mostres fixades i deshidratades es van incloure en reïna SPURR. Es van fer talls semifins de les mostres incloses en la reïna i es van observar al microscopi òptic després d'haver-los tenyit amb blau de metilè aquós 0.5%, per a localitzar les zones d'interès per a l'observació al microscopi electrònic. A continuació, es van obtenir talls ultrafins (80-100 nm) amb un ultramicrotòtom (model ULTRACUT, REICHERT (LEICA)). Els talls ultrafins es van muntar en reixetes de coure (200 mesh) i es van contrastar amb acetat d'uranil aquós 2% i citrat de plom,

seguint la tècnica de Reynolds (1963). L'observació es va realitzar amb un microscopi electrònic Zeiss EM 910 de 0.3 nm de resolució i a 60KV de voltatge d'acceleració.

#### **4. Estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae* - perera mitjançant la infiltració de discs foliars i pèrdua d'electròlits**

Es van mesurar els canvis produïts en la permeabilitat de les cèl·lules de perera durant la interacció amb bacteris fitopatògens virulents (situacions compatible i incompatible) i avirulents. Es va utilitzar la tècnica desenvolupada per Brisset (1990) per mesurar la sortida d'electròlits en teixits foliars de perera durant la interacció amb *Erwinia amylovora*.

##### **4.1. Material vegetal**

Es van utilitzar plantes de perera de la varietat Passe Crassane obtingudes de llavor i mantingudes en hivernacle fins al moment de les inoculacions. Les inoculacions es van realitzar en plantes joves, d'aproximadament 1 mes amb brots en creixement actiu.

##### **4.2. Inòcul**

Es van inocular els bacteris *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37, *P. syringae* pv. *syringae* 2831 i *P. syringae* pv. *tabaci* 2106. Les soques 2027.37 i 2831 són aïllades de perera, la primera és una soca virulenta i desenvolupa la reacció compatible en ser inoculada en una varietat sensible de perera, i la segona és avirulenta i no desenvolupa reacció en ser inoculada en perera. La soca *P. syringae* pv. *tabaci* 2106 és patògena i virulenta en tabac, desenvolupa la reacció incompatible en ser inoculada en perera. Les característiques i procedència de les tres soques es descriuen a la Taula 2.3.

L'inòcul es va preparar a partir de cultius purs de les diferents soques crescuts durant 24 h a 25°C en agar B de King (King i col., 1954). Es van preparar suspensions resuspenent els cultius de cada placa (en els que s'havia realitzat una sembra en superfície) en 10 ml d'aigua destil·lada estèril i es va fer un rentat per centrifugació durant 10 minuts a 12 000 g i 5°C. El precipitat es va resuspendre en amortidor fins a l'obtenció

d'una concentració d'inòcul d' $1 \times 10^9$  ufc ml<sup>-1</sup>. Es va utilitzar l'amortidor MES (àcid 2-[N-morfino] etanosulfònic) 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM (pH 6).

### **4.3. Infiltració de les suspensions bacterianes en els discs de fulla**

Tot el material de laboratori es va rentar amb aigua àcida (àcid clorhídric 10%) i es va esterilitzar a l'autoclau abans de la seva utilització.

La infiltració es va realitzar en discs de fulles utilitzant les fulles basals de les plantes. Les fulles es van desinfectar submergint-les en una solució d'hipoclorit sòdic comercial (1.25% clor actiu) durant 3-4 minuts, seguit de dos rentats amb aigua corrent i un rentat amb aigua destil·lada. Una vegada desinfectades es van tallar discs foliars de 12 mm de diàmetre procurant no agafar els nervis principals, ni fer ferida, i es van col·locar en tubs que contenien 15 ml de la suspensió bacteriana o d'amortidor MES (àcid 2-[N-morfino] etanosulfònic) 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM (pH 6). La infiltració de les suspensions o l'amortidor es va realitzar fent el buit (30 KPa) durant 20 minuts. A continuació es van eixugar els discs sobre paper de filtre estèril en la campana de flux laminar. Per cada tractament es van fer 4 repeticions amb 5 discs per repetició. Els discs infiltrats amb l'amortidor es van utilitzar com a control no inoculat amb bacteris.

Els 5 discs de cada repetició es van col·locar en tubs amb 10 ml d'amortidor MES 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM (pH 6) i es van incubar a 25° C, llum (8000 Lux) i agitació durant 48 hores.

### **4.4. Recompte de la quantitat de bacteris infiltrats per disc de fulla**

Per cada repetició es van agafar 3 discs de fulla acabats d'infiltrar amb les suspensions bacterianes. Es van eixugar en la campana de flux laminar i es van triturar i homogeneïtzar en 2 ml d'aigua destil·lada estèril. Es van fer dilucions 1:10 en aigua destil·lada estèril de l'homogeneïtzat i es van sembrar 20 µl de les dilucions 10<sup>-2</sup> i 10<sup>-3</sup> en agar B de King (King i col., 1954). Les plaques es van col·locar durant 48 h a 25° C i fosc i es va fer el recompte del nombre de colònies. La concentració de bacteris infiltrats es va expressar en ufc disc<sup>-1</sup>.

#### **4.5. Determinació dels canvis en la permeabilitat dels teixits de discs de fulla**

Els canvis de permeabilitat es van quantificar mesurant la conductivitat de les solucions d'incubació dels discs de fulla infiltrats amb les suspensions bacterianes o amb la solució d'amortidor. Les lectures es van efectuar a l'inici de la incubació i cada dues hores durant les 6-8 primeres hores d'incubació. A partir de les 8 hores d'incubació les lectures es van efectuar a intervals de temps més llargs (cada 4-12 h). Per mesurar la conductivitat es va utilitzar un conductímetre manual (XE 170, Hanna Instruments).

Adicionalment es va determinar la conductivitat màxima de cada mostra considerant que aquesta corresponia a la conductivitat del medi d'incubació quan s'hagués produït la sortida de tots els electròlits de les cèl·lules al medi extracel·lular. Per aconseguir la sortida de tots els electròlits es procedia, al final de la incubació, a congelar els discs en les solucions d'incubació a  $-80^{\circ}\text{C}$  i al cap de 12-24 h es descongelaven passant les mostres directament del congelador a aigua bullint, al bany Maria, durant 10 minuts. Una vegada descongelades es va mesurar la conductivitat de la solució d'incubació de cada mostra refredada a  $20-25^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.6. Disseny experimental**

Es va realitzar un disseny experimental totalment aleatoritzat, amb un factor (soca bacteriana) de quatre nivells (tres soques i el control). Cada tractament va constar de 4 repeticions amb cinc discs per repetició.

#### **4.7. Tractament de les dades i anàlisi estadística**

Als valors de conductivitat corresponents a cada temps, repetició i tractament s'hi va restar la conductivitat inicial (mesurada en el moment d'iniciar la incubació) amb la finalitat d'homogeneïtzar les dades en l'origen. Amb aquests nous valors de conductivitat relativitzats per la conductivitat inicial de cada mostra es van realitzar totes les anàlisis estadístiques.

#### 4.7.1. Anàlisi de la cinètica de pèrdua d'electròlits

Per obtenir paràmetres cinètics a partir dels valors de conductivitat es va considerar que la sortida d'electròlits de la cèl·lula vegetal al llarg del temps és funció de la quantitat màxima d'electròlits que pot sortir ( $C_{max}$ ) i de la quantitat d'electròlits que ha sortit de la cèl·lula en cada moment ( $C$ ), és a dir, de la quantitat d'electròlits susceptible de sortir en cada instant. Aquesta relació es pot descriure amb la següent equació diferencial que correspon a un model no lineal mecanicista (Draper i Smith, 1981)

$$\frac{dC}{dt} = K(C_{max} - C) \quad (1)$$

on  $K$  és una constant que correspon a la taxa de sortida d'electròlits. Integrant l'equació anterior obtenim

$$C = C_{max} (1 - \beta e^{-Kt}) \quad (2)$$

funció coneguda com a *funció de cinètica monomolecular*, utilitzada tant per explicar aspectes de creixement o desenvolupament d'organismes vius en diferents àmbits de la botànica, zoologia i ecologia, com de reaccions químiques i bioquímiques (Draper i Smith, 1981).

Aquesta funció parteix del punt  $C_{max}(1-\beta)$  en el temps 0, i tendeix a  $C_{max}$ . En el nostre experiment vam considerar, per tots els tractaments,  $\beta=1$  en haver homogeneïtzat els valors de conductivitat inicial (conductivitat inicial=0).

La funció del model monomolecular descrita no té punt d'inflexió. En aquesta funció s'assumeix que la taxa de sortida d'electròlits és constant en el temps. Però en el cas que la taxa de sortida d'electròlits ( $K$ ) fos variable al llarg del temps (existència, per exemple, d'un període de latència o retard en la sortida d'electròlits), caldria considerar  $K$  com una funció del temps  $K(t)$ . El cas més senzill és la relació lineal següent:

$$K(t) = K_0 + b t \quad (3)$$

on  $K_0$  i  $b$  són paràmetres. Substituint  $K(t)$  en lloc de  $K$  en l'equació 2 es pot escriure

$$C = C_{max} (1 - e^{(-K_0 t + \frac{bt^2}{2})}) \quad (4)$$



Aquest model matemàtic és el que finalment hem utilitzat en aquest treball per ajustar la cinètica de sortida d'electròlits en teixits vegetals infiltrats amb bacteris.

L'assumpció que la variable dependent  $K$ , taxa de sortida d'electròlits de les cèl·lules en el nostre cas, és variable en el temps s'ha utilitzat en models de creixement (entre ells el model monomolecular) i de desenvolupament d'epidèmies (Madden i Campbell, 1990; Moreno, 1994; Marín, 1996).

Els paràmetres del model monomolecular (equació 5) es van estimar per cada una de les repeticions i tractaments a partir dels valors de conductivitat  $C_i$  ( $i= 1, 2, \dots, n$ ), en els temps ( $t_1, t_2, \dots, t_n$ ). Per l'estimació dels paràmetres es va utilitzar un mètode de regressió no lineal (Draper i Smith, 1981; SAS Institute, 1989). El terme  $\varepsilon_i$  correspon a l'error.

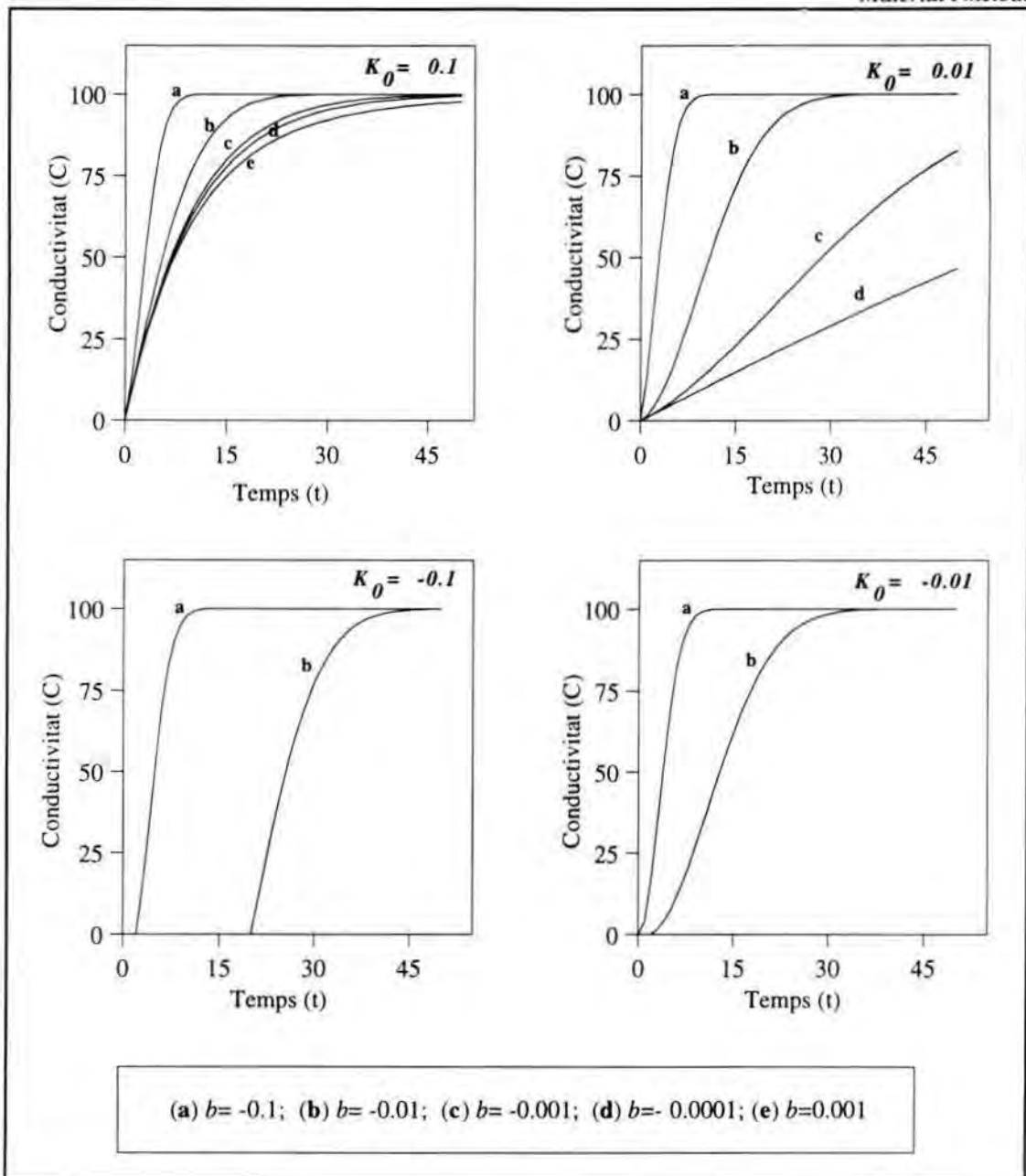
$$C_i = C_{max} (1 - e^{(-K_0 t + \frac{bt^2}{2})}) + \varepsilon_i \quad (5)$$

L'ajust es va efectuar mitjançant el mètode de Gauss-Newton que utilitza la primera derivada del model respecte cada paràmetre (Draper i Smith, 1981; SAS Institute, 1989). Va ser necessari fixar prèviament el valor  $C_{max}$  en cada experiment, així com els valors inicials dels paràmetres  $K_0$  i  $b$  a partir dels quals s'iniciaria la iteració per estimar els seus valors en el model.

Per iniciar les iteracions, els valors inicials dels dos paràmetres en el model matemàtic es van fixar com  $K_0=0$  i  $b=0$ .

El valor màxim de conductivitat ( $C_{max}$ ), corresponent a la quantitat màxima d'electròlits que podia sortir de discs foliars, es va determinar mesurant la conductivitat de la solució d'incubació dels discs infiltrats al final de la incubació, després d'haver sotmès les mostres a un tractament de congelació i descongelació (*conductivitat total*). Com a conductivitat màxima es va utilitzar la conductivitat total d'aquells tractaments amb valors significativament superiors segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer. En cas de no haver-hi diferències significatives entre tractaments es va utilitzar la mitjana de la conductivitat total de tots els tractaments.

A la Figura 1.4 es representen cinètiques del model monomolecular amb taxa variable en el temps (equació 4) en funció de diferents valors dels paràmetres  $K_0$  i  $b$ , considerant  $C_{max}=100$ .



**Figura 1.4.** Corbes de la cinètica de la conductivitat per diferents valors dels paràmetres  $K_0$  i  $b$  del model monomolecular amb taxa variable en el temps ( $C_{max}=100$ ).

Pels models obtinguts per cada tractament es va determinar la bondat d'ajust dels valors observats als predits (coeficient de determinació  $R^2$ ), la significació ( $P>F$ ) i es va comprovar la distribució normal dels residus mitjançant la prova de Shapiro-Wilk (Draper i Smith, 1981; Sokal i Rohlf, 1981; Abraham i Ledolter, 1983).

Per determinar l'efecte de cada tractament en la sortida d'electròlits, es van comparar els següents paràmetres obtinguts pel model:

- 1) els valors de conductivitat al final de la incubació (*conductivitat final*) en els diferents tractaments
- 2) la taxa de sortida d'electròlits, definida pels paràmetres estimats  $K_0$  i  $b$  del model matemàtic (eq. 5)
- 3) el temps necessari per a la sortida del 50% del màxim d'electròlits de la cèl·lula ( $t_{50}$ ).

Es va realitzar l'anàlisi de la variància (ANOVA) i la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ) de tots els paràmetres del model pels diferents tractaments i repeticions. Prèviament es va avaluar l'homogeneïtat de les variàncies (prova de Bartlett) i la normalitat dels residus (prova de Shapiro-Wilk).

Les anàlisis estadístiques es van realitzar amb el paquet d'aplicacions JMP per Macintosh (JMP 2.0, SAS Institute Inc.).

## RESULTATS

### 1. Efecte de la temperatura en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera

A partir dels índexs de severitat de les fulles inoculades amb les soques EPS94 i EPSLL3Y de *P. syringae* pv. *syringae* i incubades a diferents temperatures durant 48 hores es va calcular la severitat de la infecció per repetició i tractament amb la fórmula descrita a la pàg. 31. Els valors de severitat dels diferents tractaments van presentar les variàncies homogènies d'acord amb la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.236$ ) i els residus es van distribuir de forma normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.95$ ,  $(P<W)=0.237$ ). L'anàlisi de la variància va mostrar un efecte molt significatiu de la temperatura d'incubació en la severitat de la infecció (Taula 1.6). No es va observar efecte significatiu de la soca de patogen inoculada ni de la interacció soca-temperatura.

Es van obtenir nivells de severitat de la infecció significativament inferiors en les fulles incubades a les temperatures de 15 i 30 °C que a 20 i 25 °C, per les dues soques de patogen. No es van observar diferències significatives entre els valors de severitat obtinguts a 15 i 30°C ni entre els obtinguts a 20 i 25 °C segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ) (Figura 1.5).

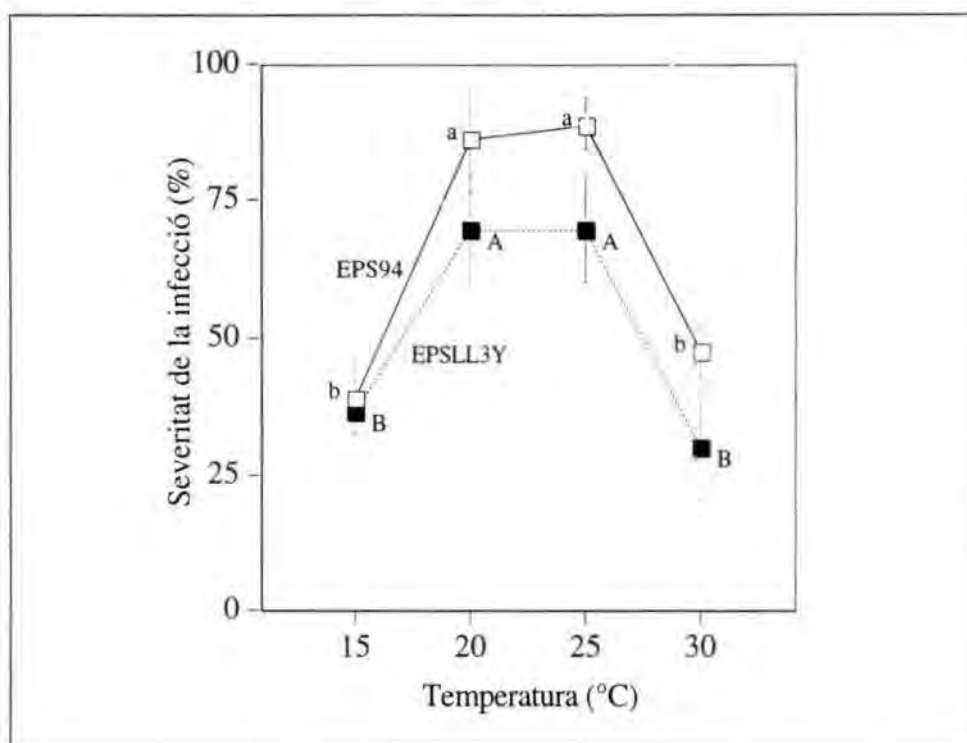
**Taula 1.6.** Efecte de la temperatura i la soca de patogen en la severitat de la infecció en fulles de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae*

Font de variació	Graus de llibertat	Suma de quadrats	F	P>F
Soca <sup>a</sup>	1	11.57	0.05	0.8248
Temperatura <sup>b</sup>	3	9429.98	13.75	0.0001
Soca x Temp	3	240.16	0.35	0.7895
Error	16	3657.41		

Anàlisi realitzada amb la mitjana dels valors de severitat de la infecció de tres repeticions per tractament

<sup>a</sup> Es van inocular les soques EPS94 i EPSLL3Y de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles joves de plantes de perera de la varietat Conference

<sup>b</sup> Les fulles inoculades es van incubar durant 48 h a les temperatures: 15, 20, 25 i 30 °C



**Figura 1.5.** Severitat de la infecció en funció de la temperatura d'incubació. Fulles de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb les soques EPS94 i EPSLL3Y de *P. syringae* pv. *syringae*. Cada valor correspon a la mitjana de tres repeticions. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana. Valors de severitat amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives segons la prova de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ).

## 2. Efecte de l'edat de la fulla en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera

Es van inocular fulles joves (últimes fulles formades sobre el brot de l'any) i velles (formades sobre el brot de més d'un any) de plantes de perera de la varietat Conference amb les soques EPS94 i EPSLL3Y de *P. syringae* pv. *syringae*. A les 48 h d'incubació es va avaluar la presència d'infeccions i la severitat mitjançant els índexs de severitat descrits a la Taula 1.1. A partir dels índexs de severitat per fulla es va calcular la severitat per cada repetició de cada tractament amb la fórmula descrita a la pàg. 31. Les variàncies dels valors de severitat dels diferents tractaments es van mostrar homogènies d'acord amb la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.439$ ) i els residus van presentar una distribució normal d'acord amb la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.97$ ,  $(P<W)=0.866$ ). L'anàlisi de la variància va mostrar un efecte significatiu de l'edat de la fulla en la severitat de la infecció. També es va observar un efecte significatiu de la soca de patogen (gairebé en el límit de la significació ( $P=0.02$ )), però no de la interacció edat-soca (Taula 1.7).

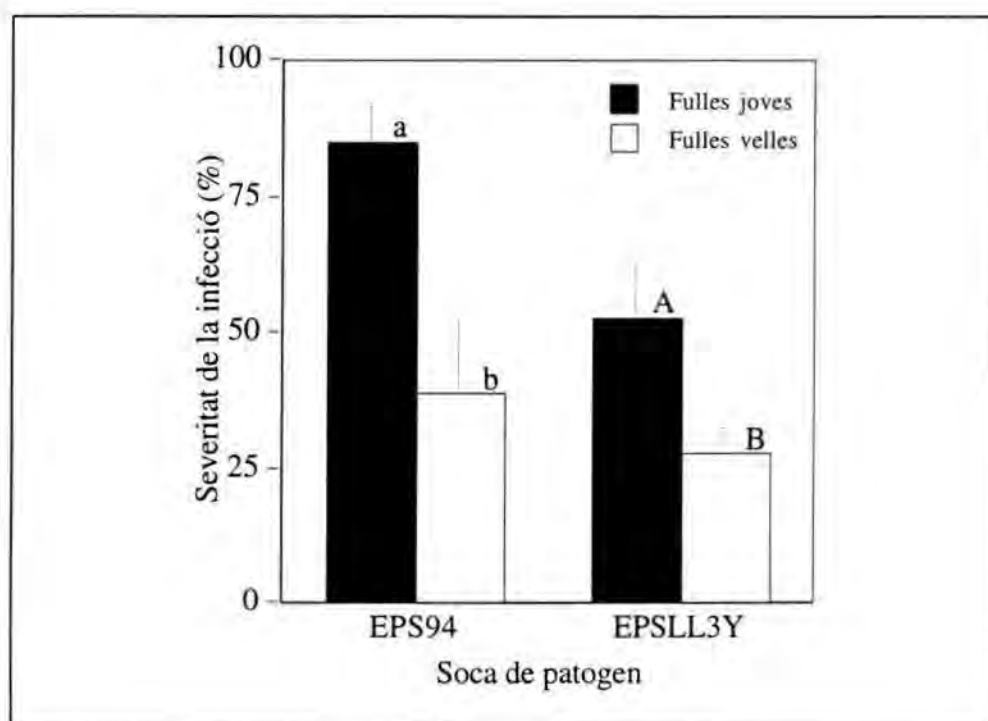
**Taula 1.7.** Efecte de l'edat de la fulla en la severitat de la infecció en inocular *P. syringae* pv. *syringae* en fulles de plantes de perera de la varietat Conference

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
Soca <sup>a</sup>	1	1390.33	7.94	0.0226
Edat fulla <sup>b</sup>	1	3763.02	21.49	0.0017
Soca x Edat	1	325.52	1.86	0.2098
Error	8	1400.46		

Anàlisi realitzada amb la mitjana dels valors de severitat de la infecció de tres repeticions per tractament

<sup>a</sup> Es van inocular les soques EPS94 i EPSLL3Y de *P. syringae* pv. *syringae*

<sup>b</sup> Les inoculacions es van realitzar en fulles joves i velles



**Figura 1.6.** Severitat de la infecció en funció de l'edat de la fulla en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb les soques EPS94 i EPSLL3Y de *P. syringae* pv. *syringae*. La severitat es va avaluar a les 48 hores de la incubació de les fulles a 25°C, 16h llum i 18°C, 8 h fosc i humitat relativa superior al 90%. Cada valor correspon a la mitjana de tres repeticions. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana. Valors de severitat amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives segons la prova de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ).

L'efecte de l'edat de la fulla en la severitat de la infecció per cada una de les soques de patogen es va determinar mitjançant la prova de Tukey-Kramer de separació de mitjanes ( $P=0.05$ ). Per les dues soques la severitat de la infecció va ser significativament superior en les fulles joves, formades sobre brots de l'any, que en les fulles velles, formades sobre brots de més d'un any (Figura 1.6). Els nivells de severitat observats en les fulles joves varen ser de gairebé el doble (soca EPSLL3Y) o superiors al doble (soca EPS94) dels observats en les fulles velles.

### **3. Sensibilitat de varietats europees de perera a *P. syringae* pv. *syringae* i virulència de diferents aïllats del patogen**

#### **3.1. Fruits immadurs**

##### **3.1.1. Sensibilitat varietal**

A la Taula 1.8 es mostra la freqüència de cada un dels índexs de severitat (descrits a la Taula 1.4) en fruits de 25 varietats europees de perera inoculats amb dues soques de *P. syringae* pv. *syringae*. Els fruits inoculats amb aigua destil·lada i els inoculats amb *P. fluorescens* EPSB4 (sapròfit) no van desenvolupar símptomes.

La distribució de freqüències dels índexs de severitat va ser diferent, per cada una de les varietats, en funció de la soca de patogen inoculada. En les inoculacions realitzades amb la soca EPS17a es van obtenir menor freqüència d'infeccions i nivells severitat inferiors que en les inoculacions realitzades amb la soca 2027.37 per totes les varietats avaluades (Taula 1.8).

En les inoculacions realitzades amb la soca EPS17a de *P. syringae* pv. *syringae* es van obtenir necrosis localitzades en el punt d'inoculació, és a dir infeccions no desenvolupades per la superfície del fruit. En les varietats El Dorado i Kaiser no es van observar infeccions (absència de símptomes) en la majoria de les inoculacions realitzades (>60% de les inoculacions) amb aquesta soca. Amb la soca 2027.37, en canvi, en la majoria de varietats es va observar una elevada freqüència d'infeccions progressives per la superfície del fruit, en major o menor grau en funció de la varietat. Per la majoria de varietats es va obtenir una elevada freqüència (>80% de les inoculacions) de necrosis de fins a 0.5 cm de diàmetre. En altres varietats com Super Comice i Passe Crassane en més

del 50% de les inoculacions es van obtenir necrosis de fins a 1 cm de diàmetre i en les varietats B. Hardy, Conference i General Leclerc la superfície necrosada va ser superior a 1 cm de diàmetre en més del 70 % de les inoculacions (Taula 1.8). La varietat El Dorado, en canvi, va desenvolupar poques infeccions progressives, i la majoria de les inoculacions (>70%) van presentar necrosis localitzades al punt d'inoculació.

**Taula 1.8.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fruits de diferents varietats de perera inoculats amb dues soques de *P. syringae* pv. *syringae*

Varietat <sup>a</sup>	Soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>									
	EPS17a					2027.37				
	Índex de severitat <sup>b</sup>					Índex de severitat <sup>b</sup>				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Abate Fétel	5	22	0	0	0	0	1	14	1	11
Alexandrine	0	27	0	0	0	0	3	24	0	0
Beurre Anjou	0	27	0	0	0	0	0	27	0	0
Beurre Hardy	0	18	9	0	0	0	0	0	6	21
Comice	0	27	0	0	0	0	3	24	0	0
Conference	0	27	0	0	0	0	3	3	0	21
Devoe	0	27	0	0	0	0	0	27	0	0
El Dorado	21	6	0	0	0	0	21	3	3	0
Ercolini	9	18	0	0	0	0	0	24	3	0
General Leclerc	0	27	0	0	0	0	0	0	0	27
Grand Champion	0	18	0	0	0	0	0	12	6	9
Guyot	0	27	0	0	0	0	3	24	0	0
Guyot Precoç	0	27	0	0	0	0	3	18	3	3
Kaiser	18	9	0	0	0	0	0	18	6	3
Magness	0	21	3	3	0	0	0	27	0	0
MB-6	0	27	0	0	0	0	3	24	0	0
Morettini	0	27	0	0	0	0	0	27	0	0
Packam's Triumph	3	24	0	0	0	0	3	24	0	0
Passe Crassane	0	27	0	0	0	0	0	9	18	0
Pierre Corneille	0	27	0	0	0	0	0	27	0	0
Président Heron	0	27	0	0	0	0	3	15	3	6
Rocha	0	24	3	0	0	3	0	21	3	0
Star	0	27	0	0	0	0	0	27	0	0
Super Comice	0	27	0	0	0	0	0	6	15	6
Williams	0	27	0	0	0	0	0	27	0	0

<sup>a</sup> Els fruits es van inocular per picada amb una agulla estèril impregnada amb cultius purs de cada soca crescuts en agar B de King. Per cada varietat i soca es van inocular 9 fruits amb tres inoculacions per fruit

<sup>b</sup> Cada índex de severitat correspon a un nivell d'infecció del patogen per la superfície del fruit als 4 dies de la incubació a 25 °C, 16h llum i 18 °C, 8h fosc i humitat relativa superior a 90% (veure descripció dels índexs a la Taula 1.4). Per cada soca i varietat s'indica el nombre d'inoculacions que van presentar cada un dels índexs de severitat



A partir de la freqüència dels índexs de severitat per cada tractament es va obtenir un model loglineal significatiu que relaciona la freqüència dels índexs de severitat amb la varietat de perera i la soca de patogen. En obtenir un model amb bon ajust ( $P > \chi^2 < 0.05$ ) (Taula 1.9) es va procedir a determinar l'efecte de la varietat, la soca i la interacció en la severitat de la infecció (Taula 1.10).

**Taula 1.9.** Anàlisi del model loglineal obtingut per relacionar la severitat de les infeccions en fruits amb la varietat de perera i la soca de *P. syringae* pv. *syringae*

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>-Logversemblança</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Model	49	372.03	744.07	0.0000
Error	400	217.15		

Model loglineal obtingut a partir de les freqüències observades de cada un dels índexs de severitat per cada tractament (Taula 1.8)

**Taula 1.10.** Efecte de la varietat de perera i la soca de *P. syringae* pv. *syringae* en la severitat de la infecció en fruits immadurs

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Varietat <sup>a</sup>	24	97.18	0.0000
Soca <sup>a</sup>	1	30.46	0.0000
Varietat x soca	24	47.00	0.0033

Anàlisi realitzada amb el model loglineal obtingut per predir l'índex de severitat en funció de la varietat i la soca  
<sup>a</sup> Es van inocular fruits immadurs de 25 varietats europees de perera amb les soques EPS17a i 2027.37 de *P. syringae* pv. *syringae*

L'anàlisi va mostrar un efecte significatiu de la varietat de perera i de la soca de patogen en la severitat de la infecció en fruits (Taula 1.10). En observar-se un efecte significatiu de la soca es va procedir a determinar l'efecte de la varietat per cada una de les soques per separat. Es van obtenir nous models loglineals, un per soca, amb la freqüència dels índexs de severitat en funció de la varietat seguint el mateix procediment utilitzat per a l'obtenció del model global.

**Taula 1.11.** Anàlisi dels models loglineals obtinguts per cada soca de patogen que relacionen l'índex de severitat de la infecció en fruits immadurs amb la varietat de perera

	<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>-Logversemblança</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
<i>soca 2027.37</i>	Model	24	81.67	163.35	0.0000
	Error	200	170.11		
<i>soca EPS17a</i>	Model	24	53.55	107.10	0.0000
	Error	200	39.48		

Models loglineals obtinguts pel mètode de modelització de dades categòriques de màxima versemblança a partir de les freqüències observades de cada un dels índexs de severitat per varietat i soca (Taula 1.8)

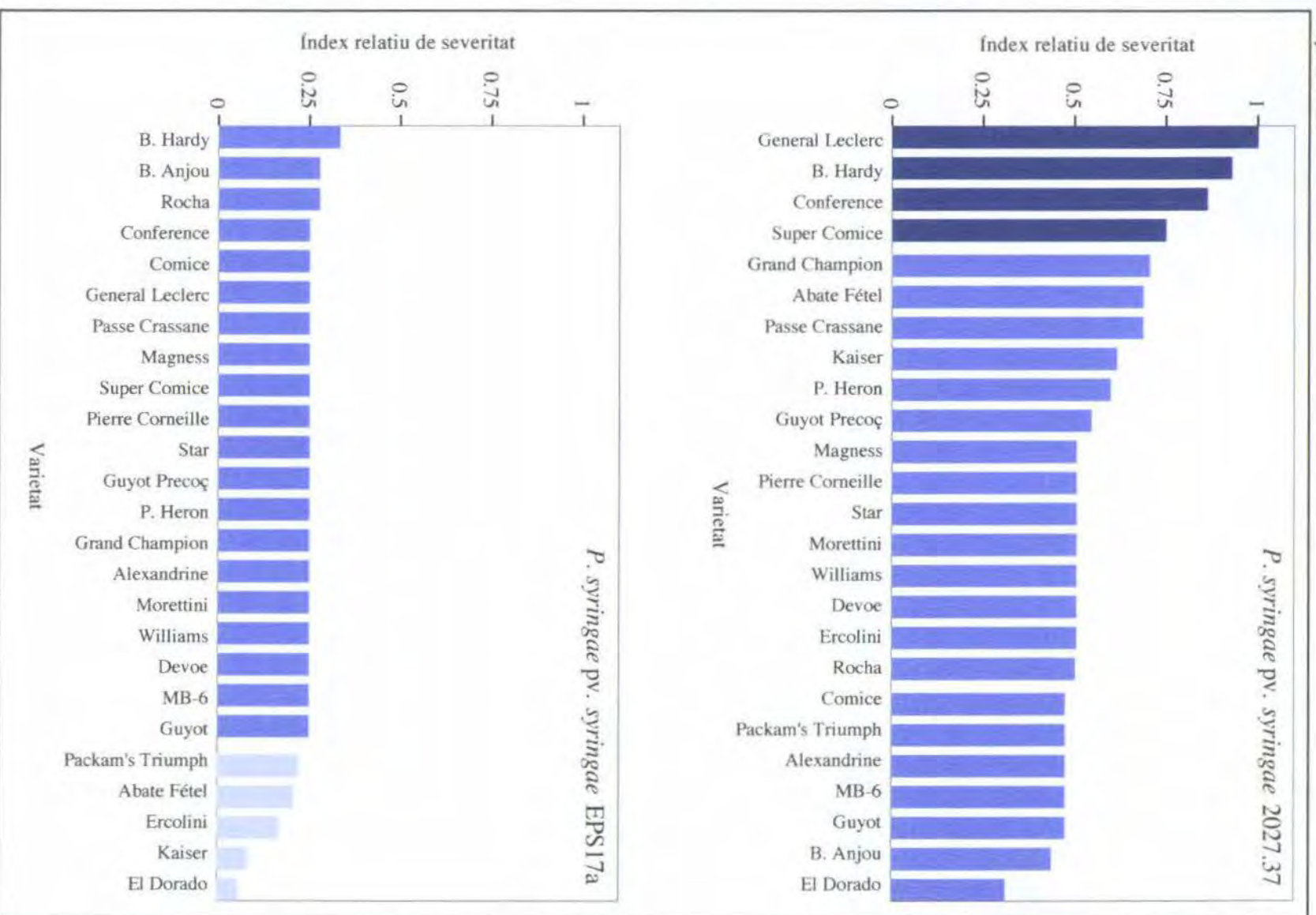
**Taula 1.12.** Efecte de la varietat de perera en la severitat de la infecció en fruits immadurs en inocular dues soques de *P. syringae* pv. *syringae*

	<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
<i>soca 2027.37</i>	Varietat <sup>a</sup>	24	86.72	0.0000
<i>soca EPS17a</i>	Varietat <sup>a</sup>	24	14.80	0.9262

Anàlisi realitzada amb els models loglineals obtinguts per cada soca de patogen per predir l'índex de severitat en funció de la varietat  
<sup>a</sup> Es van inocular fruits immadurs de 25 varietats europees de perera amb les soques EPS17a i 2027.37 de *P. syringae* pv. *syringae*

Es van obtenir models amb bon ajust per les dues soques ( $(P > \chi^2) < 0.05$ ) (Taula 1.11). Es va observar un efecte significatiu de la varietat en les inoculacions realitzades amb la soca 2027.37 de *P. syringae* pv. *syringae* ( $(P > \chi^2) < 0.001$ ), mentre que no es va observar efecte de la varietat amb la soca EPS17a (Taula 1.12).

A partir dels índexs de severitat predits pels models per cada varietat i soca es van calcular els índexs relatius de severitat ( $I_s$ ). Aquests índexs relatius de severitat es van obtenir dividint l'índex de severitat predit per l'índex de severitat màxim ( $I_s = 4$ ). Aquesta transformació va permetre ordenar les diferents varietats de més a menys sensibles (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Sensibilitat de fruits immadurs de diferents varietats de perera a *P. syringae* pv. *syringae*. Els índexs relatius de severitat es van obtenir dividint l'índex de severitat predit pel model per l'índex de severitat màxim.

Totes les varietats de perera avaluades van mostrar una sensibilitat similar a la soca EPS17a de *P. syringae* pv. *syringae*, amb una severitat baixa ( $I_s < 0.30$ ) (Figura 1.7).

Per la soca 2027.37 de *P. syringae* pv. *syringae* es van observar diferents graus de sensibilitat en funció de la varietat de perera ( $0.25 < I_s < 1$ ). Les varietats General Leclerc, B. Hardy, Conference i Super Comice es van mostrar molt sensibles ( $I_s > 0.75$ ), mentre que la resta de varietats van presentar una sensibilitat mitjana ( $0.25 < I_s < 0.75$ ). La varietat El Dorado va ser la menys sensible, amb nivells de severitat inferiors als de la resta de varietats per les dues soques de *P. syringae* pv. *syringae*.

### 3.1.2. Virulència del patogen

A la Taula 1.13 es mostra la freqüència dels índexs de severitat observats als 4 dies de la incubació de fruits immadurs de quatre varietats de perera inoculats amb les soques 1392, 2027.37, S8, EPS17a, EPS94, EPSMV4 i EPSLL3Y de *P. syringae* pv. *syringae*.

Tot i obtenir freqüències dels índexs de severitat per cada soca diferents en funció de la varietat, el comportament de cada una de les soques va ser similar en totes les varietats. La soca EPS17a en la majoria de les inoculacions va produir necrosi localitzades en el punt d'inoculació (en més del 80% de les inoculacions en les varietats Rocha i Williams i en el 100% en les varietats Conference i Passe Crassane). Per la soca S8 es va observar també una elevada freqüència de necrosi localitzades en el punt d'inoculació (100% de les inoculacions en les varietats Rocha i Williams i 50% en la varietat Conference), o bé, en el cas de desenvolupar infecció, la necrosi era inferior a 0.5 cm de diàmetre (50% de les inoculacions en la varietat Conference i 100% de les inoculacions en la varietat Passe Crassane). La soca 1392 va donar diferents nivells de severitat en funció de la varietat. En la varietat Williams no es van desenvolupar infeccions progressives per la superfície del fruit (100% de les inoculacions van donar índex de severitat 2). En canvi, en les varietats Passe Crassane i Rocha va desenvolupar infeccions per la superfície del fruit amb necrosi inferiors a 0.5 cm de diàmetre (varietat Rocha) o d'entre 0.5 i 1 cm de diàmetre (varietat Passe Crassane). Les soques 2027.37, EPS94, EPSMV4 i EPSLL3Y van desenvolupar infeccions per la superfície del fruit a partir del punt d'inoculació en totes les varietats, amb elevada freqüència de necrosi de fins a 1 cm de diàmetre en les varietats Passe Crassane, Rocha i Williams i superiors a 1 cm de diàmetre en la varietat Conference.

**Taula 1.13.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fruits de quatre varietats de perera inoculats amb diferents soques de *P. syringae* pv. *syringae*

Soca <sup>a</sup>	Varietat																			
	Conference					Passe Crassane					Rocha					Williams				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
1392	-	-	-	-	-	0	0	6	21	0	0	0	27	0	0	0	27	0	0	0
2027.37	0	0	6	0	21	0	0	9	18	0	3	0	21	3	0	3	0	21	3	0
S8	0	12	15	0	0	0	0	27	0	0	0	27	0	0	0	0	27	0	0	0
EPS17a	0	27	0	0	0	0	27	0	0	0	0	24	3	0	0	0	24	3	0	0
EPS94	0	0	9	0	18	0	0	27	0	0	0	0	27	0	0	0	0	27	0	0
EPSMV4	0	0	6	3	18	0	0	27	0	0	0	0	9	18	0	0	0	9	0	0
EPSLL3Y	0	0	15	0	9	0	0	27	0	0	0	0	27	0	0	0	0	27	0	0

<sup>a</sup> Els fruits es van inocular per picada amb una agulla estèril impregnada amb cultius purs en agar B de King de cada soca del patogen. Per cada varietat i soca es van inocular 9 fruits amb tres inoculacions per fruit

<sup>b</sup> Cada índex de severitat correspon a un nivell d'infecció del patogen per la superfície del fruit als 4 dies de la incubació a 25 °C, 16 h llum i 18°C, 8 h fosc i humitat relativa superior a 90% (veure descripció dels índexs a la Taula 1.4). Per cada soca i varietat s'indica el nombre d'inoculacions que van presentar cada un dels índexs de severitat

A partir de les freqüències observades de cada un dels índexs de severitat es va obtenir un model loglineal que relaciona la freqüència dels índexs de severitat amb la varietat i la soca de patogen. La bondat d'ajust del model es va avaluar amb la prova de  $\chi^2$  de la relació de probabilitats (Taula 1.14). El model obtingut va presentar una component d'error baixa (34% ). En obtenir un model amb bon ajust ( $(P > \chi^2) < 0.05$ ) es va determinar l'efecte de la soca de patogen i la varietat de perera en la severitat de la infecció en fruits immadurs (Taula 1.15). Es va observar un efecte molt significatiu de la soca de patogen ( $(P > \chi^2) < 0.001$ ) i significatiu de la interacció soca-varietat ( $(P > \chi^2) = 0.018$ ) en la severitat de la infecció. La significació de la varietat en la severitat va estar en el límit ( $(P > \chi^2) = 0.051$ ).

A partir dels índexs de severitat predits pel model per cada una de les soques de patogen i varietats de perera es van calcular els índexs relatius de virulència ( $I_v$ ). Aquests índexs es van obtenir dividint l'índex de severitat predit pel model per l'índex màxim establert ( $I_s = 4$ ). Aquesta transformació va permetre ordenar les soques en funció de la seva virulència (Figura 1.8).

**Taula 1.14.** Anàlisi del model obtingut per relacionar l'índex de severitat en fruits immadurs amb la varietat de perera i la soca de *P. syringae* pv. *syringae*

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>-Logversemblança</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Model	27	178.32	356.64	0.0000
Error	215	92.23		

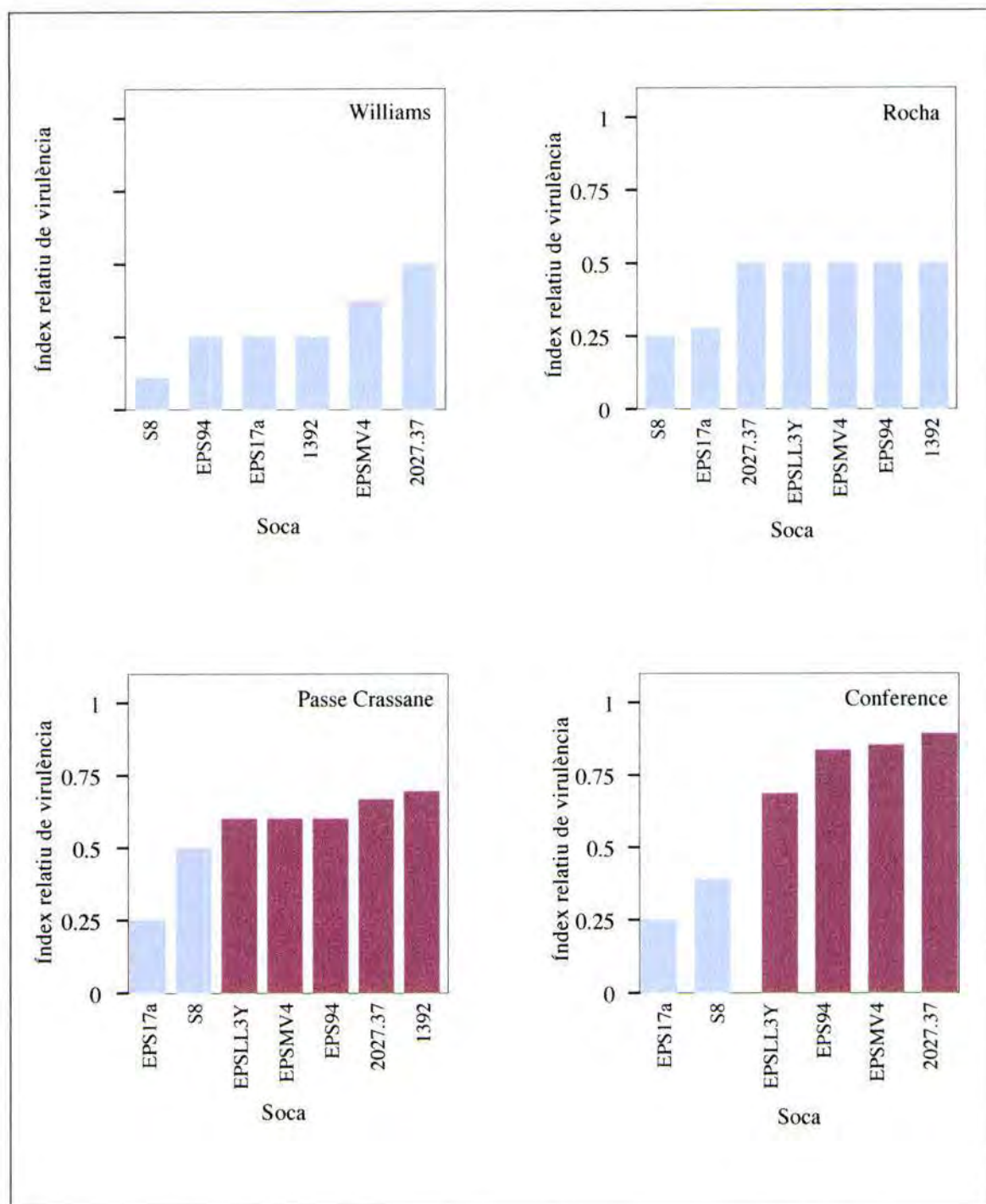
Model loglineal obtingut a partir de les freqüències observades dels índexs de severitat per cada tractament

**Taula 1.15.** Efecte de la varietat de perera i la soca de *P. syringae* pv. *syringae* en la severitat de la infecció en fruits immadurs

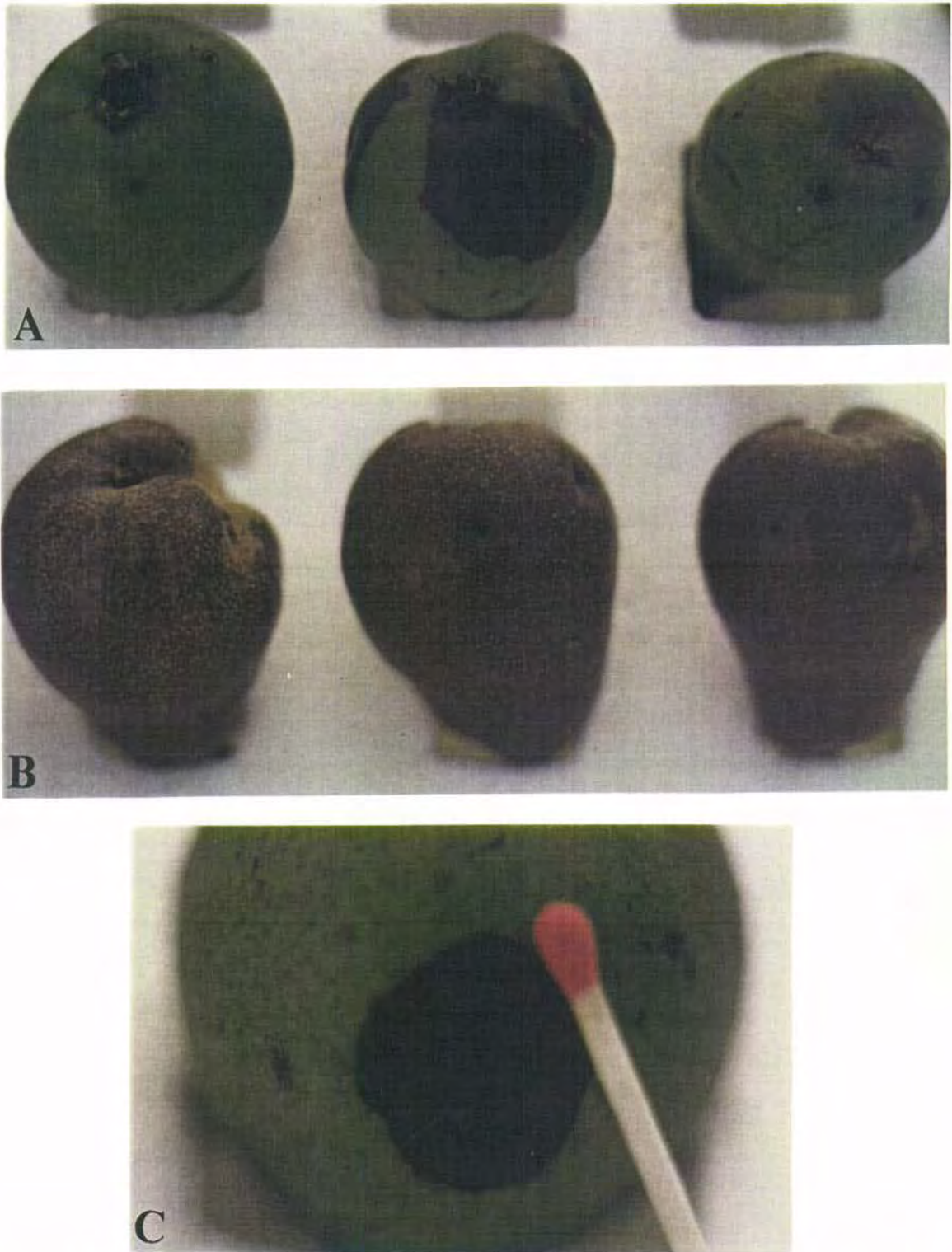
<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Varietat <sup>a</sup>	3	3.81	0.0510
Soca <sup>a</sup>	6	49.94	0.0000
Varietat x soca	18	29.97	0.0181

Anàlisi realitzada amb el model loglineal que relaciona l'índex de severitat amb la varietat i soca  
<sup>a</sup> Es van inocular fruits immadurs de les varietats Conference, Passe Crassane, Williams i Rocha amb les soques 1392, S8, 2027.37, EPS94, EPSMV4 i EPSLL3Y de *P. syringae* pv. *syringae*

A la Figura 1.8 s'observen diferents graus de virulència en les soques de *P. syringae* pv. *syringae* inoculades en fruits immadurs de les diferents varietats de perera. La soca EPS17a es va mostrar poc virulenta, amb un índex relatiu de virulència ( $I_v$ ) de 0.25 en totes les varietats. La soca S8 també es va mostrar poc virulenta en les varietats Conference, Rocha i Williams ( $I_v < 0.5$ ) i mitjanament virulenta en la varietat Passe Crassane ( $I_v = 0.5$ ). Les soques 2027.37, EPS94, EPSMV4 i EPSLL3Y es van mostrar virulents en les varietats Conference i Passe Crassane ( $I_v > 0.50$ ) i poc virulents en les varietats Rocha i Williams. En general, totes les soques es van mostrar poc virulents en ser inoculades en les varietats Rocha i Williams, amb índexs relatius de virulència inferiors a 0.5.



**Figura 1.8.** Virulència de soques de *P. syringae* pv. *syringae* en fruits immadurs de diferents varietats de perera. La severitat de la infecció es va avaluar als 4 dies de la incubació a 25°C, 16 h llum i 18 °C, 8 h fosc i humitat relativa superior a 90%. Els Índexs relatiu de virulència per cada soca es van calcular dividint l'índex de severitat predit pel model per l'índex de severitat màxim ( $I_s=4$ ).



**Figura 1.9.** Síntomes de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en fruits immadurs de diferents varietats de perera. **A**, varietats sensibles inoculades amb soques que han mostrat diferent grau de virulència. Varietat Conference inoculada amb la soca EPS17a (esquerra), i amb la soca EPS94 (centre); varietat Passe Crassane inoculada amb la soca EPS17a (dreta). **B**, detall de la infecció de la soca 2027.37 (virulenta) en la varietat MB-6 (poc sensible). **C**, la mateixa soca inoculada en fruits de la varietat Passe Crassane (sensible).



### 3.2. Fulles

A les Taules 1.16 i 1.17 es mostra la freqüència dels índexs de severitat observats en les inoculacions de fulles de 45 varietats europees de perera amb 7 soques de *P. syringae* pv. *syringae*. En les fulles inoculades amb aigua destil·lada estèril i amb *P. fluorescens* EPSB4 (sapròfit) no es van desenvolupar símptomes.

Es va obtenir diferent freqüència dels índexs de severitat en funció de la soca per cada una de les varietats avaluades. En general, la majoria de varietats van presentar elevada freqüència d'infeccions progressives pels nervis de la fulla i fins i tot per la superfície foliar (índexs de severitat de 2 a 4) en les inoculacions realitzades amb les soques 2027.37, EPS94, EPSMV4 i EPSLL3Y. En les inoculacions realitzades amb les soques 1392, S8 i EPS17 es va obtenir una elevada freqüència d'absència d'infeccions i d'infeccions localitzades al punt d'inoculació. Per aquestes soques, en cas d'observar-se infeccions només van progressar pel nervi principal de la fulla i en pocs casos pels secundaris, no estenent-se per la superfície foliar. En les inoculacions realitzades amb les soques 2027.37, EPS94, EPSMV4 i EPSLL3Y es va observar major variabilitat en la freqüència dels índexs en les diferents varietats que en les inoculacions realitzades amb les soques 1392, S8 i EPS17. Les varietats B. Hardent Point, Maxine, Rogue Red, Winter Nellis i les autòctones MB-6, MB-7, MB-12, MB-14 i MB-20 van desenvolupar infeccions localitzades al punt d'inoculació o bé no van mostrar símptomes d'infecció en ser inoculades amb les soques 2027.37, EPS94, EPSMV4 i EPSLL3Y. La resta de varietats van mostrar una elevada freqüència d'infeccions progressives pel nervi principal de la fulla (Alexandrine, B. Anjou, El Dorado, General Leclerc, MB-11, MB-22, OHF333, Packam's Triumph, Passe Crassane i Star), pels altres nervis (Abate Fétel, B. Hardy, Blanquilla, Bonne Louise, Comice, Conference, Devoe, Épine du Mas, Grand Champion, Highland, Magness, MB-19, MB-21, MB-25, Morettini, Pierre, Corneille, Président Heron, Red Rogne, Rocha, Super Comice i Williams) i per la superfície de la fulla en la varietat Guyot Precoç.

A partir de les freqüències dels índexs de severitat es va determinar l'efecte de la varietat de perera i soca de patogen en la severitat de la infecció (Taula 1.19). Addicionalment es va avaluar l'efecte de la varietat per cada una de les soques (Taula 1.20) i l'efecte de la soca per algunes de les varietats (Abate Fétel, Alexandrine, B. Anjou, B. Hardy, Blanquilla, Comice, Conference, General Leclerc, Maxine, MB-14, Morettini i Passe Crassane) (Taula 1.21).

**Taula 1.16.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fulles de varietats europees de perera inoculades amb diferents soques de *P. syringae* pv. *syringae*

Varietat	Soca																			
	2027.37					EPS94					EPSMV4					EPSLL3Y				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Abate Fétel	0	0	6	3	0	0	0	0	7	2	0	1	0	8	0	0	0	3	5	1
Alexandrine	0	0	9	0	0	0	5	4	0	0	0	4	5	0	0	0	4	5	0	0
Beurre Anjou	0	2	7	0	0	0	1	8	0	0	0	1	6	2	0	0	4	5	0	0
Beurre Hardent Point	1	7	1	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	7	2	0	0
Beurre Hardy	0	0	2	6	1	0	2	2	5	0	0	0	1	6	2	0	0	1	6	2
Blanquilla	0	1	3	5	0	0	1	0	8	0	0	3	3	3	0	0	4	4	1	0
Bonne Louise	0	0	2	5	2	0	1	0	6	2	0	0	0	8	1	0	0	4	5	0
Comice	0	0	2	7	0	0	0	2	6	1	0	0	0	9	0	0	0	3	6	0
Conference	0	0	1	8	0	0	0	1	6	2	0	0	0	1	8	0	0	0	8	1
Devoe	0	0	0	9	0	0	1	2	6	0	0	0	2	7	0	0	0	0	9	0
El Dorado	0	0	4	5	0	0	1	5	3	0	0	2	6	1	0	0	4	5	0	0
Épine du Mas	0	0	1	6	2	0	2	3	4	0	0	0	6	3	0	0	0	3	6	0
Flor d'hivern	0	0	3	6	0	0	2	3	3	1	2	7	0	0	0	0	0	6	3	0
General Leclerc	0	0	7	2	0	0	0	8	1	0	0	0	5	4	0	0	1	8	0	0
Grand Champion	0	0	0	9	0	0	0	2	7	0	0	0	2	7	0	0	1	6	2	0
Guyot Precoç	0	0	0	2	7	0	0	0	5	4	0	0	0	3	6	0	0	0	7	2
Highland	0	0	0	9	0	0	2	4	3	0	0	1	8	0	0	0	0	0	9	0
Kaiser	0	2	5	2	0	0	0	1	7	1	0	2	1	6	0	0	0	0	7	2
Magness	0	2	3	4	0	0	3	2	3	1	1	3	0	5	0	0	2	4	3	0
Maxine	0	1	6	2	0	0	9	0	0	0	0	5	4	0	0	0	4	5	0	0
MB-6	1	4	4	0	0	3	5	1	0	0	0	9	0	0	0	0	4	5	0	0
MB-7	0	3	6	0	0	2	7	0	0	0	0	9	0	0	0	2	6	1	0	0
MB-11	0	4	3	2	0	0	2	5	2	0	0	0	9	0	0	0	2	5	2	0
MB-12	1	4	4	0	0	0	7	2	0	0	0	5	4	0	0	0	4	4	1	0
MB-14	0	9	0	0	0	2	7	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0
MB-19	0	0	2	7	0	0	2	5	2	0	0	6	2	1	0	0	0	0	6	3
MB-20	0	2	1	6	0	1	6	1	1	0	0	7	2	0	0	0	1	3	5	0
MB-21	0	0	0	9	0	0	0	1	8	0	0	1	7	1	0	0	0	0	9	0
MB-22	0	1	3	5	0	0	3	5	1	0	0	7	2	0	0	0	1	6	2	0
MB-25	0	1	0	8	0	0	0	2	7	0	0	7	2	0	0	0	0	0	9	0
Morettini	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	1	1	4	3	0	0	0	0	9	0
OHF333	0	0	3	6	0	0	2	7	0	0	1	1	2	2	0	0	4	3	2	0
Packam's Triumph	1	1	7	0	0	0	1	5	3	0	0	1	1	7	0	0	1	6	2	0
Passe Crassane	0	2	7	0	0	0	1	8	0	0	0	0	9	0	0	1	5	3	0	0
Pierre Corneille	0	0	4	5	0	0	1	4	4	0	1	1	0	7	0	0	0	0	9	0
Président Drouard	0	0	2	6	1	1	5	3	0	0	0	0	4	5	0	0	0	2	5	2
Président Heron	0	0	5	4	0	0	2	3	4	0	0	0	6	3	0	0	1	5	3	0
Red Rogne	0	3	5	1	0	0	3	4	2	0	0	2	1	6	0	0	0	3	6	0
Rocha	1	0	0	8	0	0	1	0	8	0	0	3	4	2	0	0	0	0	9	0
Rogue Red	1	8	0	0	0	0	4	3	2	0	0	9	0	0	0	1	6	2	0	0
Star	0	2	4	3	0	0	0	9	0	0	0	5	4	0	0	0	2	7	0	0
Starking	0	0	7	2	0	0	0	9	0	0	0	0	4	5	0	0	0	5	4	0
Super Comice	0	0	0	8	1	0	0	0	7	2	0	0	0	9	0	1	8	0	0	0
Williams	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	3	6	0	0	0	1	8	0
Winter Nellis	1	6	2	0	0	0	9	0	0	0	0	6	3	0	0	0	3	5	1	0

Per cada varietat es van inocular 9 fulles amb 20 µl de suspensions d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> de cada una de les soques

<sup>a</sup> Cada valor correspon al nombre de fulles de cada tractament que va presentar cada un dels índexs de severitat (descrits a la Taula 1.4) al cap de 48 h d'incubació a 25 °C, 16 h llum i 18 °C, 8 h fosc i 90% d'humitat relativa

**Taula 1.17.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fulles de varietats europees de perera inoculades amb diferents soques de *P. syringae* pv. *syringae*

Varietat	Soca														
	1392					S8					EPS17a				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Abate Fétel	3	5	1	0	0	2	7	0	0	0	0	2	7	0	0
Alexandrine	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	9	0	0
Beurre Anjou	6	3	0	0	0	6	3	0	0	0	5	4	0	0	0
Beurre Hardent Point	4	5	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0
Beurre Hardy	2	1	3	3	0	0	9	0	0	0	0	0	7	2	0
Blanquilla	0	2	3	4	0	1	8	0	0	0	1	3	5	0	0
Bonne Louise	2	5	1	1	0	0	5	4	0	0	3	4	2	0	0
Comice	8	0	0	1	0	4	3	2	0	0	6	2	1	0	0
Conference	1	6	1	1	0	0	1	5	3	0	3	3	3	0	0
Devøe	1	5	3	0	0	0	3	4	2	0	0	5	3	1	0
El Dorado	3	5	1	0	0	0	3	6	0	0	7	2	0	0	0
Épine du Mas	1	8	0	0	0	0	7	2	0	0	1	8	0	0	0
Flor d'hivern	1	2	0	6	0	2	7	0	0	0	0	5	4	0	0
General Leclerc	0	0	9	0	0	0	6	3	0	0	0	2	7	0	0
Grand Champion	3	3	3	0	0	2	4	3	0	0	1	5	3	0	0
Guyot Precoç	1	2	0	6	0	3	4	2	0	0	2	1	3	3	0
Highland	0	9	0	0	0	0	5	4	0	0	3	6	0	0	0
Kaiser	1	1	2	4	1	0	4	5	0	0	0	9	0	0	0
Magness	2	7	0	0	0	1	6	1	1	0	4	4	1	0	0
Maxine	2	7	0	0	0	0	9	0	0	0	2	7	0	0	0
MB-6	1	8	0	0	0	1	8	0	0	0	4	5	0	0	0
MB-7	2	7	0	0	0	0	8	1	0	0	3	6	0	0	0
MB-11	5	4	0	0	0	0	4	3	2	0	2	7	0	0	0
MB-12	1	6	2	0	0	0	9	0	0	0	0	7	2	0	0
MB-14	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	4	5	0	0	0
MB-19	1	8	0	0	0	0	1	6	2	0	0	6	3	0	0
MB-20	0	9	0	0	0	1	6	2	0	0	3	6	0	0	0
MB-21	0	6	3	0	0	0	5	4	0	0	0	4	5	0	0
MB-22	0	7	2	0	0	0	3	6	0	0	0	9	0	0	0
MB-25	0	8	1	0	0	0	5	4	0	0	0	6	3	0	0
Morettini	1	1	4	3	0	0	5	3	1	0	0	9	0	0	0
OHF333	3	6	0	0	0	0	9	0	0	0	4	5	0	0	0
Packam's Triumph	8	0	0	0	0	0	6	3	0	0	4	5	0	0	0
Passe Crassane	6	3	0	0	0	1	4	2	2	0	5	4	0	0	0
Pierre Corneille	3	2	1	3	0	0	8	1	0	0	2	6	1	0	0
Président Drouard	0	6	3	0	0	3	6	0	0	0	1	5	3	0	0
Président Heron	0	3	3	3	0	0	9	0	0	0	1	1	7	0	0
Red Rogne	7	2	0	0	0	4	0	0	5	0	6	3	0	0	0
Rocha	2	4	3	0	0	0	9	0	0	0	1	0	0	8	0
Rogue Red	2	7	0	0	0	1	8	0	0	0	0	9	0	0	0
Star	2	7	0	0	0	0	6	3	0	0	3	6	0	0	0
Starking	0	8	1	0	0	1	8	0	0	0	0	9	0	0	0
Super Comice	1	3	0	5	0	1	4	4	0	0	4	2	3	0	0
Williams	2	6	0	1	0	0	7	1	1	0	1	8	0	0	0
Winter Nellis	1	8	0	0	0	1	8	0	0	0	1	8	0	0	0

Per cada varietat es van inocular 9 fulles amb 20 µl de suspensions d'1x10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup> de cada soca

<sup>a</sup> Cada valor correspon al nombre de fulles de cada tractament que va presentar cada un dels índexs de severitat (descrits a la Taula 1.4) al cap de 48 hores d'incubació a 25 °C, 16 h llum i 18°C, 8 h fosc i 90% d'humitat relativa

### 3.2.1. Sensibilitat varietal

A partir de les freqüències observades dels índexs de severitat (Taules 1.16 i 1.17) es va obtenir un model que relaciona la freqüència dels índexs de severitat amb la varietat de perera i la soca de patogen. A la Taula 1.18 s'avalua la bondat d'ajust del model. En obtenir un model amb bon ajust ( $(P > \chi^2) < 0.05$ ), encara que amb una component d'error elevada (73%), es va utilitzar aquest model per determinar l'efecte de la varietat i la soca en la severitat de la infecció (Taula 1.19).

Es va observar un efecte significatiu de la varietat de perera i la soca de patogen en la severitat de la infecció en fulles. En haver-hi efecte de la soca es van obtenir models loglineals per cada una de les soques del patogen per separat, a partir de les freqüències observades dels índexs de severitat (Taula 1.20).

**Taula 1.18.** Anàlisi del model obtingut per relacionar l'índex de severitat de la infecció amb la varietat de perera i la soca de *P. syringae* pv. *syringae*

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>-Logversemblança</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Model	50	1018.39	2036.79	0.0000
Error	2784	2772.46		

Model loglineal obtingut a partir de les freqüències observades de cada un dels índexs de severitat per cada tractament (Taules 1.16 i 1.17)

**Taula 1.19.** Efecte de la varietat de perera i la soca de *P. syringae* pv. *syringae* en la severitat de la infecció en fulles

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Varietat <sup>a</sup>	44	876.15	0.0000
Soca <sup>a</sup>	6	1039.33	0.0000

Anàlisi realitzada amb el model loglineal obtingut per relacionar l'índex de severitat amb la varietat i la soca

<sup>a</sup> Es van inocular fulles de 45 varietats europees de perera amb 7 soques de *P. syringae* pv. *syringae*

**Taula 1.20.** Anàlisi dels models obtinguts per cada soca de *P. syringae* pv. *syringae* per relacionar l'índex de severitat de la infecció en fulles amb la varietat

<i>Soca de patogen</i>	<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>-Logversemblança</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
1392	Model	44	113.66	227.33	0.0000
	Error	353	355.06		
S8	Model	44	80.59	161.17	0.0000
	Error	355	310.72		
EPS17a	Model	44	106.77	213.56	0.0000
	Error	355	309.61		
2027.37	Model	44	189.50	379.00	0.0000
	Error	354	292.79		
EPS94	Model	44	194.21	388.41	0.0000
	Error	354	324.76		
EPSMV4	Model	44	194.75	389.50	0.0000
	Error	354	299.20		
EPSLL3Y	Model	44	207.24	414.48	0.0000
	Error	354	279.83		

Models obtinguts a partir de les freqüències observades dels índexs de severitat per cada tractament

Per la majoria de soques la component d'error va ser elevada (superior al 50%). Tots els models obtinguts van presentar bon ajust de les freqüències observades a les predites ( $(P > \chi^2) < 0.05$ ) (Taula 1.20), i van ser utilitzats per avaluar l'efecte de la varietat en la severitat de la infecció per cada una de les soques de patogen inoculades. Es va obtenir un efecte significatiu de la varietat en la severitat de la infecció en fulles per totes les soques de patogen (Taula 1.21).

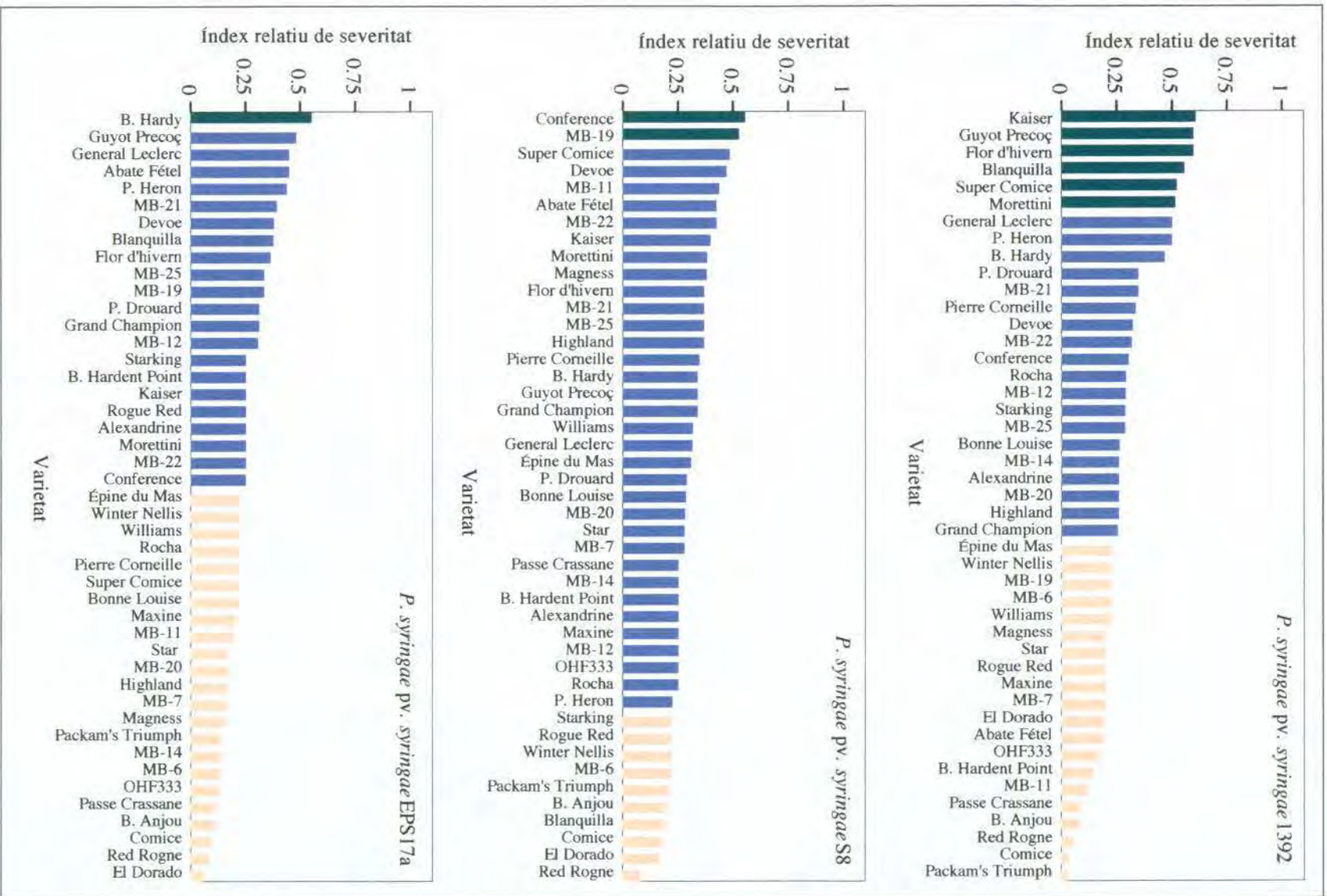
A partir dels índexs de severitat de cada varietat predits per cada model es va calcular l'índex relatiu de severitat ( $I_s$ ) per varietat. Aquests índexs es van obtenir dividint l'índex de severitat predit per l'índex de severitat màxim ( $I_s=4$ ). Aquesta transformació va permetre ordenar les diferents varietats en funció de la seva sensibilitat al patogen (Figures 1.10, 1.11 i 1.12).

**Taula 1.21.** Efecte de la varietat de perera en la severitat de la infecció en fulles en inocular diferents soques de *P. syringae* pv. *syringae*

<i>Soca</i>	<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
1392	Varietat	44	174.96	0.0000
S8	Varietat	44	123.33	0.0000
EPS17a	Varietat	44	150.47	0.0000
2027.37	Varietat	44	208.66	0.0000
EPS94	Varietat	44	190.59	0.0000
EPSMV4	Varietat	44	197.25	0.0000
EPSLL3Y	Varietat	44	188.81	0.0000

Anàlisi realitzada amb els models loglineals obtinguts per predir l'índex de severitat en funció de la varietat  
<sup>a</sup> Es van inocular fulles de 45 varietats europees de perera amb 7 soques de *P. syringae* pv. *syringae*

A les Figures 1.10, 1.11 i 1.12 es representen els índexs relatius de severitat ( $I_s$ ) de les diferents varietats per cada una de les soques de patogen. Per totes les soques es va obtenir diferent sensibilitat al patogen en funció de la varietat. Els índexs relatius de severitat obtinguts amb les soques 1392, S8 i EPS17a van ser inferiors ( $0 < I_s < 0.6$ ) als obtinguts amb les soques 2027.37, EPS94, EPSMV4 i EPSLL3Y ( $0.2 < I_s < 1$ ). En aquestes darreres es va observar una major gradació o variabilitat en la sensibilitat de les varietats. La varietat Guyot Precoç es va mostrar molt sensible a les soques 2027.37, EPS94, EPSMV4 i EPSLL3Y, amb  $I_s$  superior a 0.75. Les varietats Abate Fétel, B. Hardy, Blanquilla, Bonne Louise, Comice, Conference, Devoe, Épine du Mas, Flor d'hivern, General Leclerc, Grand Champion, Highland, Magness, MB-19, MB-21, MB-25, Kaiser, Morettini, P. Drouard, P. Heron, Packam's Triumph, Pierre Corneille, Starking, Super Comice i Williams es van mostrar sensibles al patogen, amb  $I_s > 0.5$  per les quatre soques. Les varietats Alexandrine, B. Anjou, B. Hardent Point, El Dorado, Maxine, MB-11, MB-12, MB-20, MB-22, Passe Crassane, Red Rogne, Rogue Red i Winter Nellis van mostrar-se mitjanament sensibles a la majoria de soques de *P. syringae* pv. *syringae*, amb  $0.25 < I_s < 0.5$ . Les varietats MB-6, MB-7, MB-14 i Rogue Red van ser poc sensibles ( $I_s < 0.25$ ) a la majoria de soques de *P. syringae* pv. *syringae*.



**Figura 1.10.** Sensibilitat de fulles de diferents varietats de perera a les soques 1392, S8 i EPS17a de *P. syringae* pv. *syringae*.

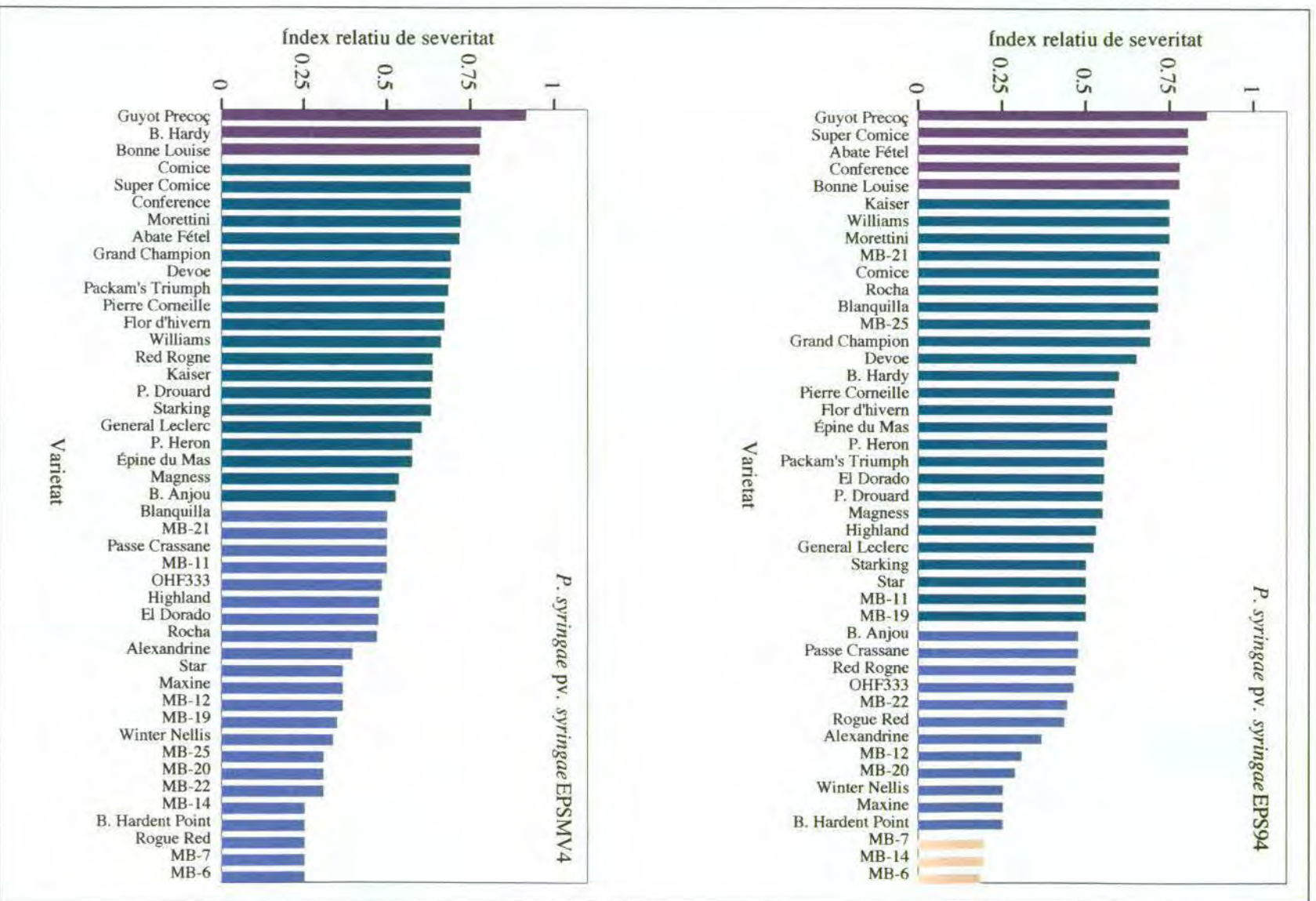
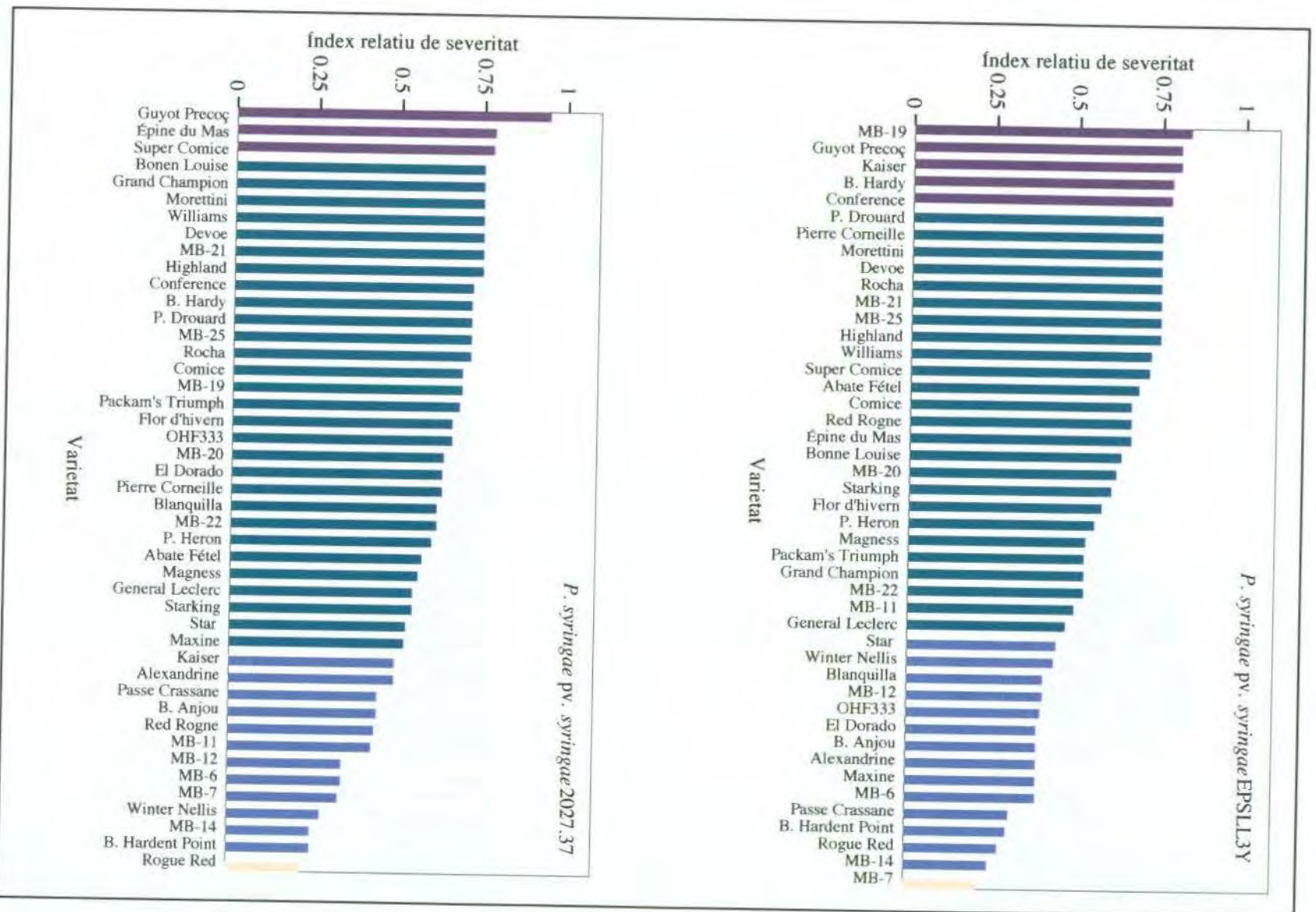


Figura 1.11. Sensibilitat de fulles de diferents varietats de perera a les soques EPS94 i EPSMV4 de *P. syringae* pv. *syringae*.





### 3.2.2. Virulència del patogen

Es va determinar estadísticament l'efecte de la soca i la seva virulència en algunes de les varietats inoculades (Abate Fétel, Alexandrine, B. Anjou, B. Hardy, Blanquilla, Comice, Conference, General Leclerc, Maxine, MB-14, Morettini i Passe Crassane). Per cada varietat es va obtenir un model loglineal per relacionar la freqüència dels índexs de severitat amb la soca de patogen. Els models obtinguts (Taula 1.22) es van utilitzar per avaluar l'efecte de la soca de patogen en la severitat de la infecció (Taula 1.23).

En algunes varietats (Abate Fétel, B. Hardy, Blanquilla, Comice, Conference, General Leclerc, i Maxine) es van obtenir models amb components d'error elevades (>50%). En altres varietats la variabilitat no explicada pel model va ser inferior al 50% de la variabilitat total (Alexandrine, Morettini i Passe Crassane) (Taula 1.22).

**Taula 1.22** Anàlisi dels models obtinguts per relacionar l'índex de severitat de la infecció en fulles de varietats de perera amb la soca de *P. syringae* pv. *syringae*

Varietat	Font de variació	Graus de llibertat	-Logversemblança	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Abate Fétel	Model	6	35.55	71.09	0.0000
	Error	56	48.27		
Alexandrine	Model	6	22.80	45.59	0.0000
	Error	56	18.55		
Beurre Anjou	Model	6	33.78	67.57	0.0000
	Error	56	39.78		
Beurre Hardy	Model	6	18.34	36.70	0.0000
	Error	56	63.40		
Blanquilla	Model	6	19.22	38.45	0.0000
	Error	56	58.60		
Comice	Model	6	31.48	62.95	0.0000
	Error	56	47.65		
Conference	Model	6	29.22	58.44	0.0000
	Error	56	48.33		
General Leclerc	Model	6	19.17	38.34	0.0000
	Error	56	30.63		
Maxine	Model	6	26.48	52.95	0.0000
	Error	56	30.01		
MB-14	Model	6	8.86	17.72	0.0069
	Error	56	10.95		
Morettini	Model	6	33.31	66.62	0.0000
	Error	56	27.57		
Passe Crassane	Model	6	34.89	69.77	0.0000
	Error	56	31.05		

Models loglineals obtinguts mitjançant el mètode de modelització de dades categòriques de màxima versemblança a partir de les freqüències observades dels índexs de severitat en cada soca (Taulas 1.16 i 1.17)

A la Taula 1.23 s'observa que l'efecte de la soca en la severitat de la infecció va ser diferent segons la varietat de perera. En algunes varietats com Abate Fétel, B. Hardy, Blanquilla, Comice, Conference, Morettini i Passe Crassane es va observar un efecte significatiu de la soca, mentre que en les varietats Alexandrine, General Leclerc, Maxine i MB-14 no es va observar efecte de la soca, en ser varietats poc sensibles. En la varietat Beurre Anjou no es va observar efecte significatiu de la soca en la severitat, tot i que els índexs de severitat van variar entre 0.2 i 0.5 en funció de la soca, degut probablement a l'elevada component d'error del model.

Amb els diferents models es van calcular els índexs relatius de virulència ( $I_v$ ) dividint l'índex de severitat predit pel model per l'índex de severitat màxim ( $I_s=4$ ). A les Figures 1.13 i 1.14 es representen els índexs relatius de virulència de cada soca per cada una de les varietats. Per les varietats en que es va obtenir un efecte significatiu de la soca en la severitat de la infecció, les soques S8, 1392 i EPS17a es van mostrar en general poc virulentes, amb índexs relatius de virulència inferiors a 0.5, i en algunes varietats fins i tot inferiors a 0.25. En les mateixes varietats les soques 2027.37, EPS94, EPSMV4 i EPSLL3Y es van mostrar virulentes amb índexs relatius de virulència superiors a 0.5. En les varietats en que no es va observar efecte significatiu de la soca es van obtenir índexs relatius de virulència baixos, en la majoria de casos inferiors a 0.5.

**Taula 1.23.** Efecte de la soca de *P. syringae* pv. *syringae* en la severitat de la infecció en fulles de diferents varietats de perera

<i>Varietat</i>	<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Abate Fétel	Soca	6	31.09	0.0000
Alexandrine	Soca	6	0.31	0.9995
Beurre Anjou	Soca	6	8.69	0.1915
Beurre Hardy	Soca	6	25.92	0.0002
Blanquilla	Soca	6	23.77	0.0006
Comice	Soca	6	32.16	0.0000
Conference	Soca	6	29.74	0.0000
General Leclerc	Soca	6	8.82	0.1839
Maxine	Soca	6	5.01	0.5418
MB-14	Soca	6	0.97	0.9866
Morettini	Soca	6	16.19	0.0127
Passe Crassane	Soca	6	23.42	0.0007

Anàlisis realitzades amb els models loglineals obtinguts per predir l'índex de severitat en funció de la soca per cada una de les varietats de perera

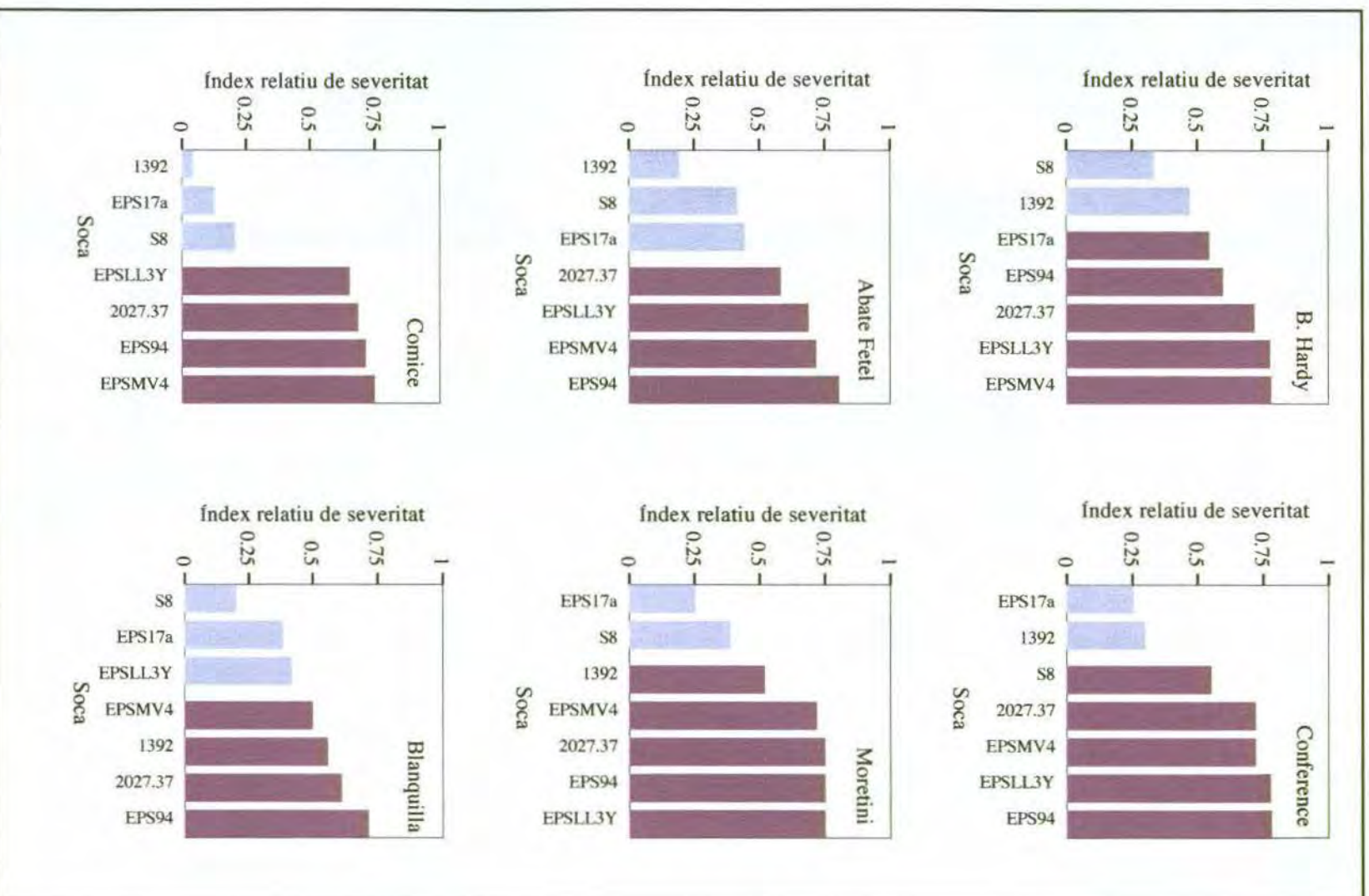
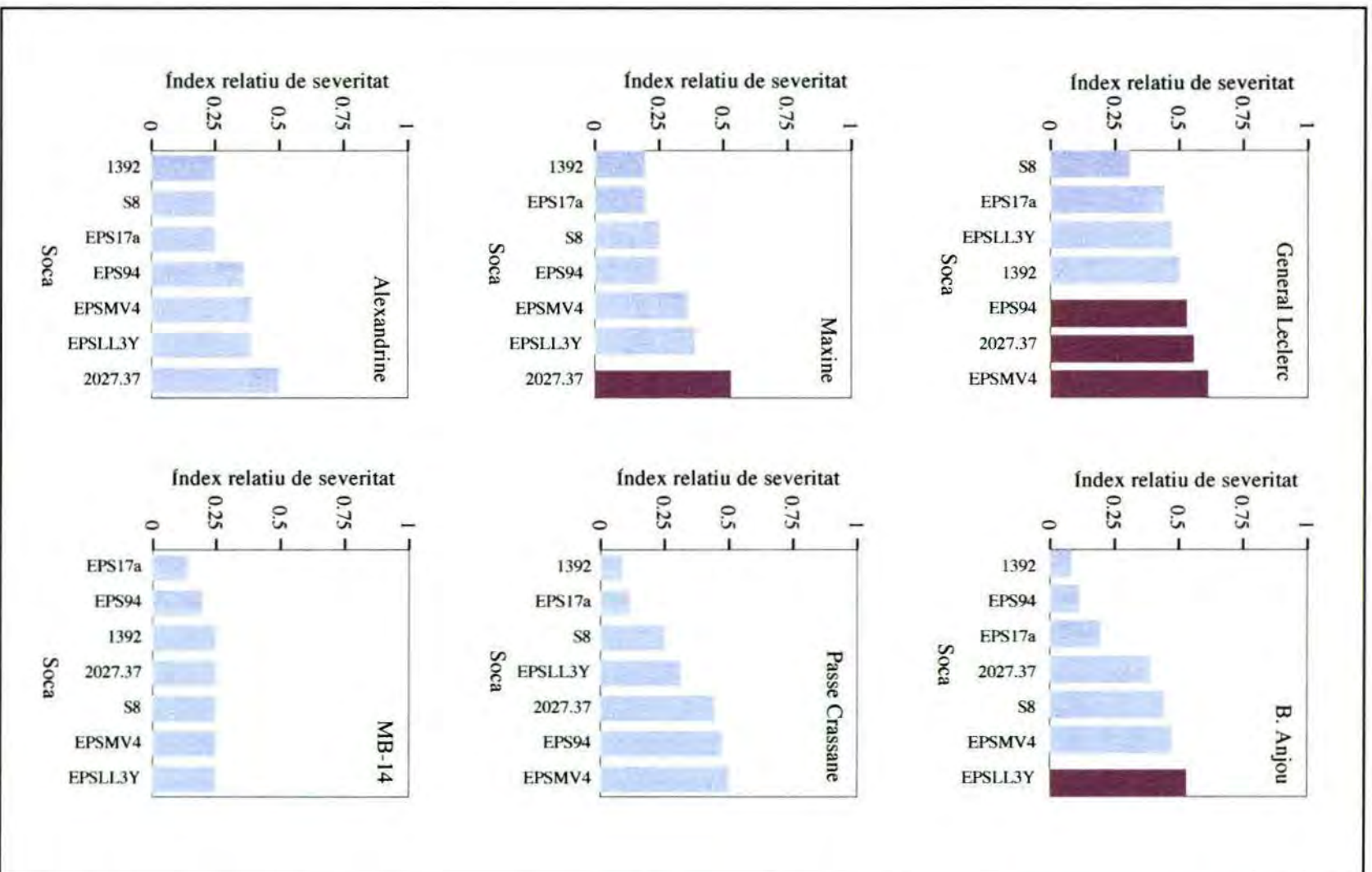


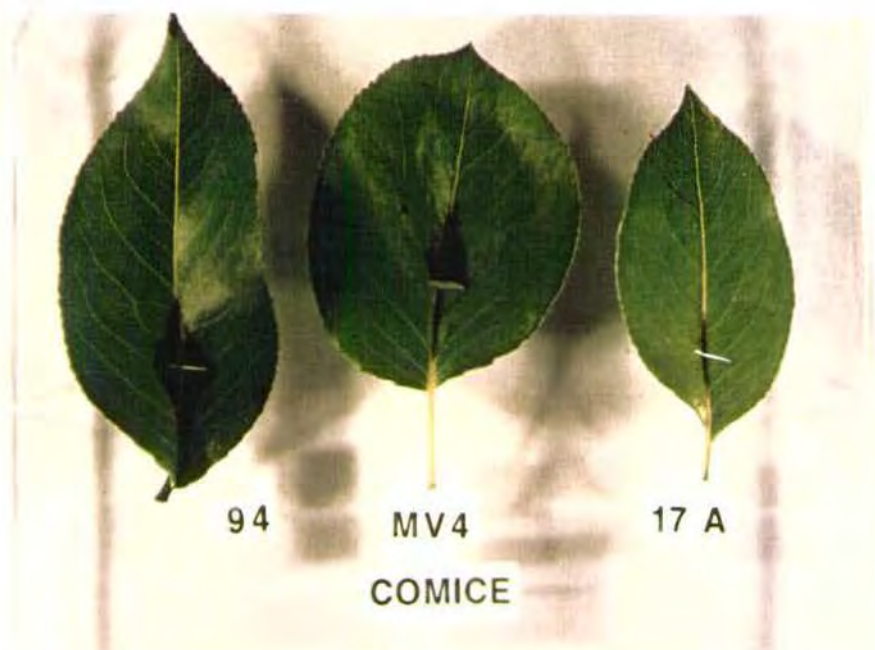
Figura 113. Virulència de soques de *P. syringae* pv. *syringae* en ser inoculades en fulles de diferents varietats de perera.



**Figura 1.14.** Virulència de soques de *P. syringae* pv. *syringae* en ser inoculades en fulles de diferents varietats de perera.



**Figura 1.15.** Síntomes de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 (soca virulenta) en fulles de perera de les varietats (A) General Leclerc (sensible) i (B) Maxine (poc sensible). C, Infecció de *P. syringae* pv. *syringae* EPS17a (soca poc virulenta) en la varietat Passe Crassane (sensible).



**Figura 1.16.** Virulència de les soques EPS94, EPSMV4, EPS17a, EPSLL3Y i 1392 de *P. syringae* pv. *syringae* inoculades en fulles de perera de les varietats Comice i Conference (sensibles).

## 4. Metodologia per a l'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera

### 4.1. Efecte de la dosi d'inòcul en la severitat de la malaltia en planta

No es van produir infeccions en les fulles inoculades amb dosis de patogen inferiors a  $1 \times 10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ . A partir d'aquesta concentració en augmentar la dosi de patogen es va produir un augment de la severitat de la malaltia arribant a valors del 100 % de severitat a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ . Per l'interval de dosis de patogen d' $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  la relació dosi patogen ( $\text{Log}_{10}$  (dosi)) - severitat de la malaltia, va ser lineal (Figura 1.17). En les fulles infiltrades amb aigua destil·lada estèril i en les infiltrades amb el bacteri sapròfit *P. fluorescens* EPSB4 no es van observar símptomes d'infecció.

Les variàncies de la severitat de la malaltia (*Sp*) transformada en Probit (*Sp*/100) van ser homogènies segons la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.579$ ) i els residus van presentar una distribució normal ( $W=0.97$ ,  $(P<W)=0.880$ ) d'acord amb la prova de Shapiro-Wilk. L'anàlisi de la covariància va indicar un efecte significatiu de la dosi de patogen en la severitat de la malaltia (Taula 1.24).

Per l'interval de dosis de patogen d' $1 \times 10^5$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  a  $1 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  es va estimar la dosi infectiva mitjana ( $\text{DE}_{50}$ : concentració de patogen necessària per produir una severitat del 50%). La  $\text{DE}_{50}$  obtinguda va ser de  $5.6 \times 10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  (Taula 1.25).

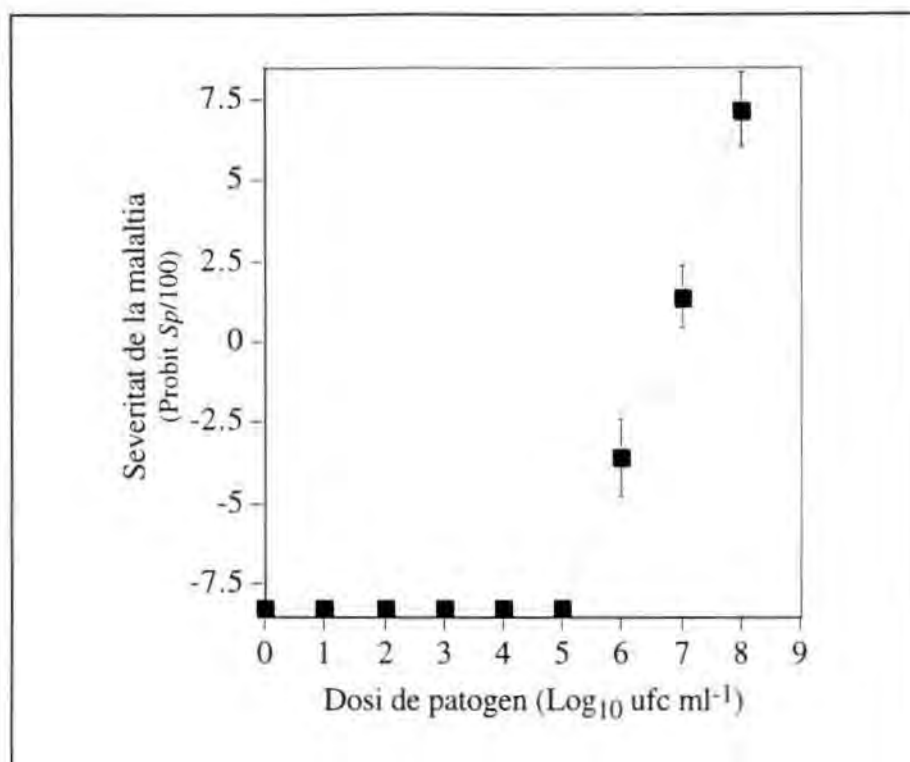
**Taula 1.24.** Efecte de la dosi de patogen en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
Dosi patogen <sup>a</sup>	1	392.72	243.17	0.0000
Error	10	16.15		

Anàlisi de la covariància realitzada amb les mitjanes dels valors de severitat (*Sp*) de tres repeticions per dosi, transformats en Probit (*Sp*/100)

<sup>a</sup> Les dosis de patogen utilitzades van ser  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$





**Figura 1.17.** Relació dosi-resposta entre els nivells de malaltia i la dosi de patogen en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Els valors corresponen a la mitjana de tres repeticions. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana ( $P=0.05$ ).

**Taula 1.25.** Determinació de la dosi infecciosa mitjana ( $DE_{50}$ ) de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference

Origen (error estàndard)	Pendent (error estàndard)	$R^2$ <sup>a</sup>	Prob>F <sup>b</sup>	$DE_{50}$ <sup>c</sup> Log <sub>10</sub> (ufc ml <sup>-1</sup> )
-34.06 (2.16)	5.12 (0.33)	0.96	0.0000	6.75 (0.0016)

<sup>a</sup>  $R^2$  de l'ajust dels valors predits pel model lineal respecte els observats  
<sup>b</sup> Probabilitat del model lineal  
<sup>c</sup> Dosi de patogen a la que es produeix el 50% de severitat de la malaltia (entre parèntesi s'indica l'error estàndard). Valor calculat a partir de la funció lineal obtinguda per regressió simple dels valors de severitat de la malaltia (*Sp*) transformats en Probit (*Sp*/100) en funció de la dosi de patogen transformada en Log<sub>10</sub> (ufc ml<sup>-1</sup>). Funció calculada per les dosis de patogen d'1 x 10<sup>5</sup> ufc ml<sup>-1</sup> a 1 x 10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup>

#### 4.2. Efecte de l'edat de la fulla en la severitat de la infecció

Es va avaluar l'efecte de la fulla en la severitat de la infecció en infiltrar *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a diferents dosis en plantes de perera de la varietat Conference. Com que es van inocular totes les fulles de la planta es va poder determinar l'efecte de la posició de la fulla en la planta (des de la base del brot fins l'àpex) i de l'edat de la fulla (fulles formades en brots de més d'un any i fulles formades en el brot de l'any). Per això es van realitzar dues anàlisis de la variància, una considerant la posició de la fulla i l'altra considerant l'edat. En els dos casos també es va determinar l'efecte de la dosi d'inòcul i de la interacció (posició fulla-dosi inòcul i edat fulla-dosi inòcul) en la severitat de la infecció (Taules 1.26 i 1.27).

**Taula 1.26.** Efecte de la posició de la fulla en la planta i la dosi de patogen en la severitat de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
Posició fulla <sup>a</sup>	12	1156.7	0.22	0.9972
Dosi patogen <sup>b</sup>	1	58402.8	131.82	0.0000
Posició x dosi	12	1303.6	0.24	0.9951
Error	88	38989.2		

Anàlisi de la covariància realitzada amb les mitjanes dels valors de severitat de tres repeticions per tractament

<sup>a</sup> Es va avaluar la severitat de la infecció per cada una de les fulles de la planta, des de la base fins la part apical del brot

<sup>b</sup> Les dosis de patogen utilitzades van ser  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>

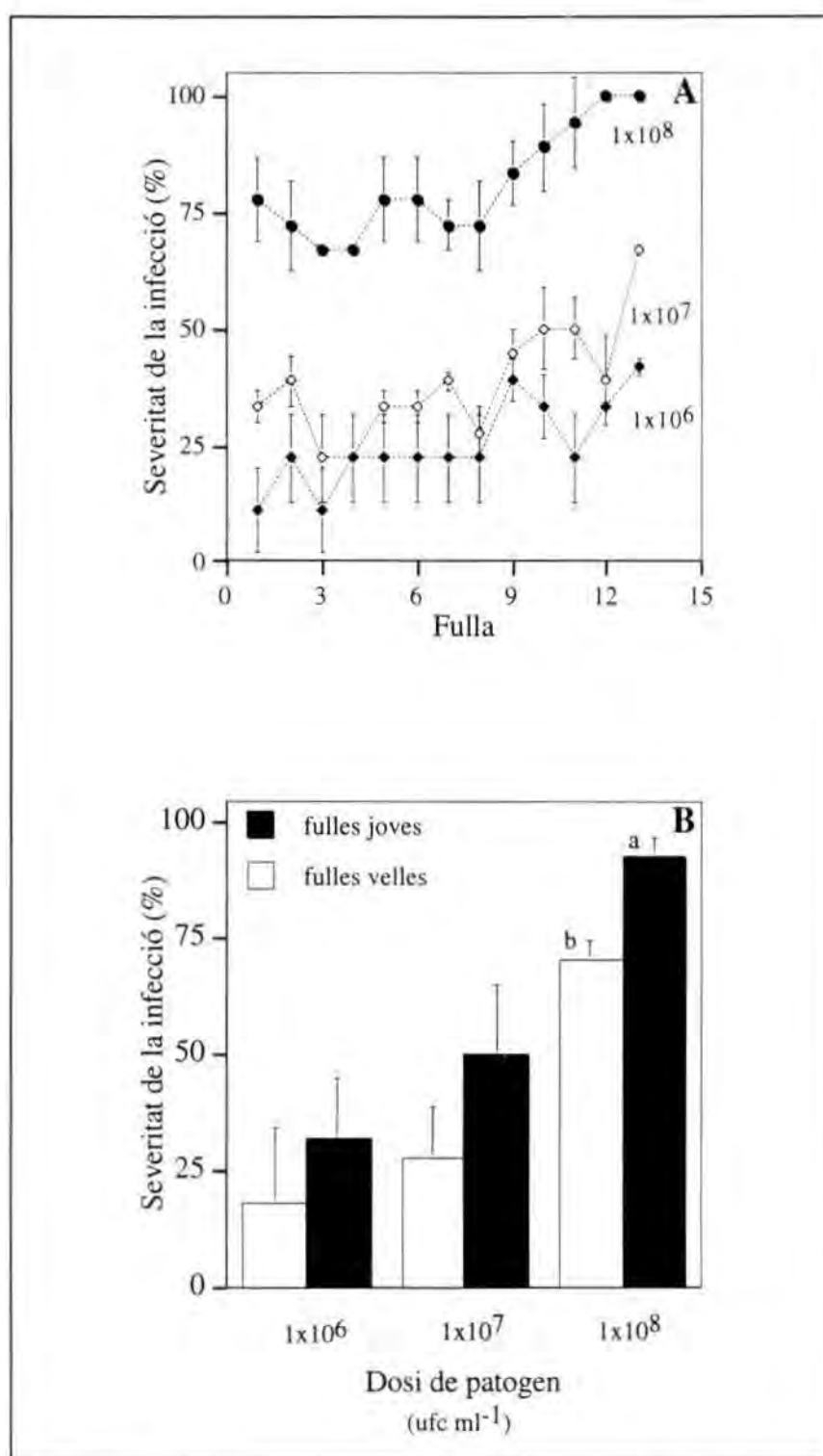
**Taula 1.27.** Efecte de l'edat de la fulla i la dosi de patogen en la severitat de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
Edat <sup>a</sup>	1	5.15	0.02	0.8809
Dosi patogen <sup>b</sup>	1	9672.72	43.73	0.0000
Edat x dosi	1	49.98	0.23	0.6418
Error	14	3096.48		

Anàlisi de la covariància realitzada amb les mitjanes dels valors de severitat de tres repeticions per tractament

<sup>a</sup> Es van considerar dues edats de la fulla: joves (formades sobre el brot de l'any) i velles (formades sobre brots de més d'un any)

<sup>b</sup> Les dosis de patogen utilitzades van ser  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>



**Figura 1.18.** Severitat de la infecció en funció de la posició de la fulla en la planta (A) i de l'edat de la fulla (B) en inocular *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a diferents dosis en plantes de perera de la varietat Conference. Els valors de severitat corresponen a la mitjana de tres repeticions. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana. Valors de severitat amb diferent lletra presenten diferències significatives segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ).

Les variàncies dels valors de severitat dels diferents tractaments per cada anàlisi (efecte de la posició fulla i efecte de l'edat de la fulla) es van mostrar homogènies ( $(P>F)=0.010$  i  $(P>F)=0.270$ , respectivament) segons la prova de Bartlett i els residus es van distribuir de forma normal d'acord amb la prova de Shapiro-Wilk ( $W>0.90$ ,  $(P<W)>0.07$ ).

L'anàlisi de la covariància va indicar un efecte molt significatiu de la dosi d'inòcul en la severitat de la infecció ( $P<0.001$ ). No es va observar efecte significatiu de la posició de la fulla en la planta (Taula 1.26), ni de l'edat de la fulla (Taula 1.27).

Tot i que no es va observar efecte significatiu de l'edat de la fulla en el model global, es va avaluar l'efecte de l'edat de la fulla en la severitat de la infecció per cada una de les dosis d'inòcul per separat. Les variàncies dels valors de severitat dels diferents tractaments per cada dosi de patogen ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ) es van mostrar homogènies segons la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.821$ ,  $0.690$  i  $0.943$ , respectivament) i els residus es van distribuir de forma normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.76$ ,  $(P<W)=0.052$ ;  $W=0.84$ ,  $(P<W)=0.115$  i  $W=0.88$ ,  $(P<W)=0.254$ , respectivament).

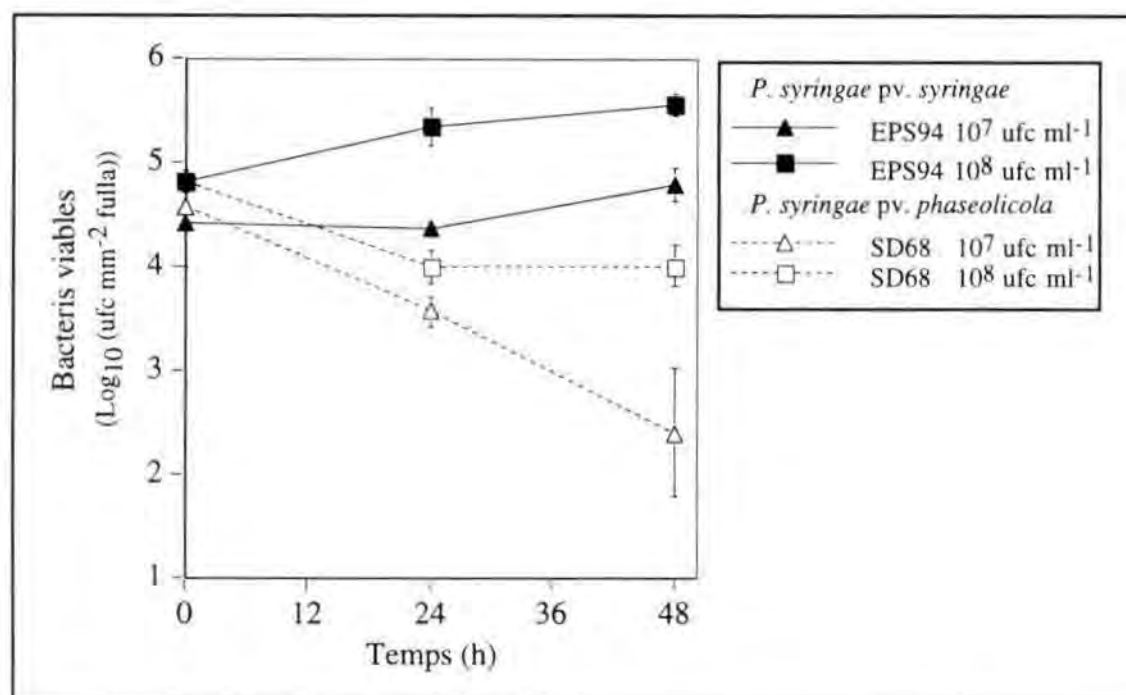
L'anàlisi de la variància va indicar un efecte significatiu de l'edat de la fulla en la severitat de la infecció a la dosi d'inòcul d' $1 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  ( $(P>F)=0.002$ ,  $R^2=0.92$ ). A les altres dosis d'inòcul no es va observar efecte significatiu de l'edat de la fulla en la severitat de la infecció ( $(P>F) > 0.10$ ).

Els valors de severitat de la infecció obtinguts en les fulles joves i en les fulles velles van ser similars per la dosi de  $10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  (20-30%) i per la dosi de  $10^7$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  (30-50%). En canvi, en les inoculacions realitzades a la dosi de  $10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  es van obtenir nivells de severitat significativament superiors en les fulles joves (90%) que en les velles (70%). A aquesta dosi d'inòcul la severitat de la infecció va ser superior a l'obtinguda a les altres dosis (Figura 1.18).

### 4.3. Evolució de la població bacteriana en plantes inoculades

Es van inocular les soques *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 i *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 a les concentracions d' $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> en fulles en plantes de perera de la varietat Conference. Es van fer recomptes del nombre de bacteris viables de cada soca en la zona inoculada a les 0, 24 i 48 h de la incubació a 25 °C, 16 h llum i 18°C, 8 h fosc i humitat relativa del 70-80 % (Figura 1.19).

Les variàncies del nombre de bacteris viables dels diferents tractaments al llarg del temps van ser homogènies segons la prova de Bartlett (( $P>F$ )=0.678) i els residus van presentar una distribució normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.95$ , ( $P<W$ )=0.188). En l'anàlisi de la variància es va observar un efecte significatiu del temps d'incubació ( $P=0.032$ ), molt significatiu de la interacció temps-soca ( $P=0.001$ ) i significatiu de la interacció temps-dosi d'inòcul ( $P=0.042$ ), en la multiplicació bacteriana en les fulles de les plantes (Taula 1.28).



**Figura 1.19.** Evolució de la població de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 i *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 inoculats a les concentracions  $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> en plantes de perera de la varietat Conference. Es van inocular per infiltració localitzada en les fulles 50 µl de les suspensions bacterianes i es van incubar a 25 °C, 16 h llum i 18 °C, 8 h fosc i 70-80% d'humitat relativa. Els valors corresponen a la mitjana de tres repeticions. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança per la mitjana ( $P=0.05$ ).

**Taula 1.28.** Efecte del tipus de bacteri i la dosi d'inòcul en la multiplicació al llarg del temps de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 i *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 en fulles en plantes de perera de la varietat Conference

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
Soca	1	0.01	0.01	0.9396
Dosi inòcul <sup>a</sup>	1	0.33	3.98	0.0624
Temps incubació <sup>b</sup>	1	0.44	5.42	0.0325
Soca x dosi inòcul	1	0.01	0.03	0.8460
Soca x temps	1	1.29	15.71	0.0010
Temps x dosi inòcul	1	0.40	4.83	0.0420
Error	29	1.39		

Anàlisi de la covariància realitzada amb la mitjana del nombre de bacteris viables transformats en ( $\text{Log}_{10}$  ufc  $\text{mm}^{-2}$ ) de les tres repeticions de cada tractament

<sup>a</sup> Els bacteris es van inocular a les dosis d'1 x 10<sup>7</sup> i 1 x 10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> L'avaluació de la població bacteriana en les fulles es va realitzar a les 0, 24 i 48 h de les inoculacions

En la situació compatible, corresponent a la inoculació de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en plantes de la varietat Conference, es va observar un augment de la població bacteriana en la zona infiltrada a les 24 i 48 hores per les dues dosis de patògen. Tant a les 24 com a les 48 hores de les inoculacions els nivells de bacteris viables en la zona infiltrada eren lleugerament superiors en les fulles inoculades amb 1 x 10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup>.

En la situació incompatible, corresponent a *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 patògena de mongetera inoculada en perera, els nivells de bacteris viables en les fulles van disminuir al cap de 24 i 48 hores respecte els inicials, per les dues dosis de bacteri. En les fulles en que s'havien inoculat suspensions d'1x10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup> els nivells poblacionals a les 48 hores havien disminuït en un factor de 10, mentre que en les inoculacions d'1 x 10<sup>7</sup> ufc ml<sup>-1</sup> la població va disminuir en un factor de 100 respecte els nivells inicials (Figura 1.19).

#### 4.4. Desenvolupament de símptomes i infeccions

Els símptomes observats en les fulles i les necrosis produïdes van ser diferents en funció del tipus d'interacció i de la concentració bacteriana. Amb la soca EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* es van observar necrosis progressives per la superfície de la fulla des del punt d'inoculació, més severes a la dosi màxima de patogen ( $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>). A les dues dosis de patogen es van començar a observar símptomes d'infecció als 2-3 dies de les inoculacions i les necrosis van anar progressant al llarg dels temps. Als 5 dies de les inoculacions es van observar necrosis ben desenvolupades (Figura 1.20 A). Les necrosis eren brunes, de consistència tova, aquosa, característiques de les infeccions bacterianes en teixit vegetal. En cas de ser necrosis expansives el límit entre la zona necrosada i el teixit sa era difús.

En les fulles inoculades amb *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 no es van observar símptomes fins als 3-4 dies d'incubació. En les inoculacions realitzades amb el bacteri a la concentració d' $1 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> en la majoria de les fulles no es van observar símptomes, tot i que en algunes fulles es van observar necrosis localitzades al punt d'inoculació. En les fulles inoculades amb el bacteri a la concentració d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> es van observar símptomes clars al cap de 5 dies, consistents en necrosis limitades a una àrea reduïda al voltant del punt d'inoculació. Totes les necrosis observades en les inoculacions amb *P. syringae* pv. *phaseolicola* eren de consistència seca i molt localitzades, observant un límit ben definit entre la zona necrosada i el teixit sa (Figura 1.20 B). En algunes fulles al cap de 7 dies de les inoculacions el teixit necrosat s'havia desprès de la fulla i havia quedat un forat.



**Figura 1.20.** Síntomes macroscòpics de la inoculació per microinfiltració localitzada en fulles de plantes de perera de la varietat Conference dels bacteris (A) *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 (interacció compatible) i (B) *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 (interacció incompatible).



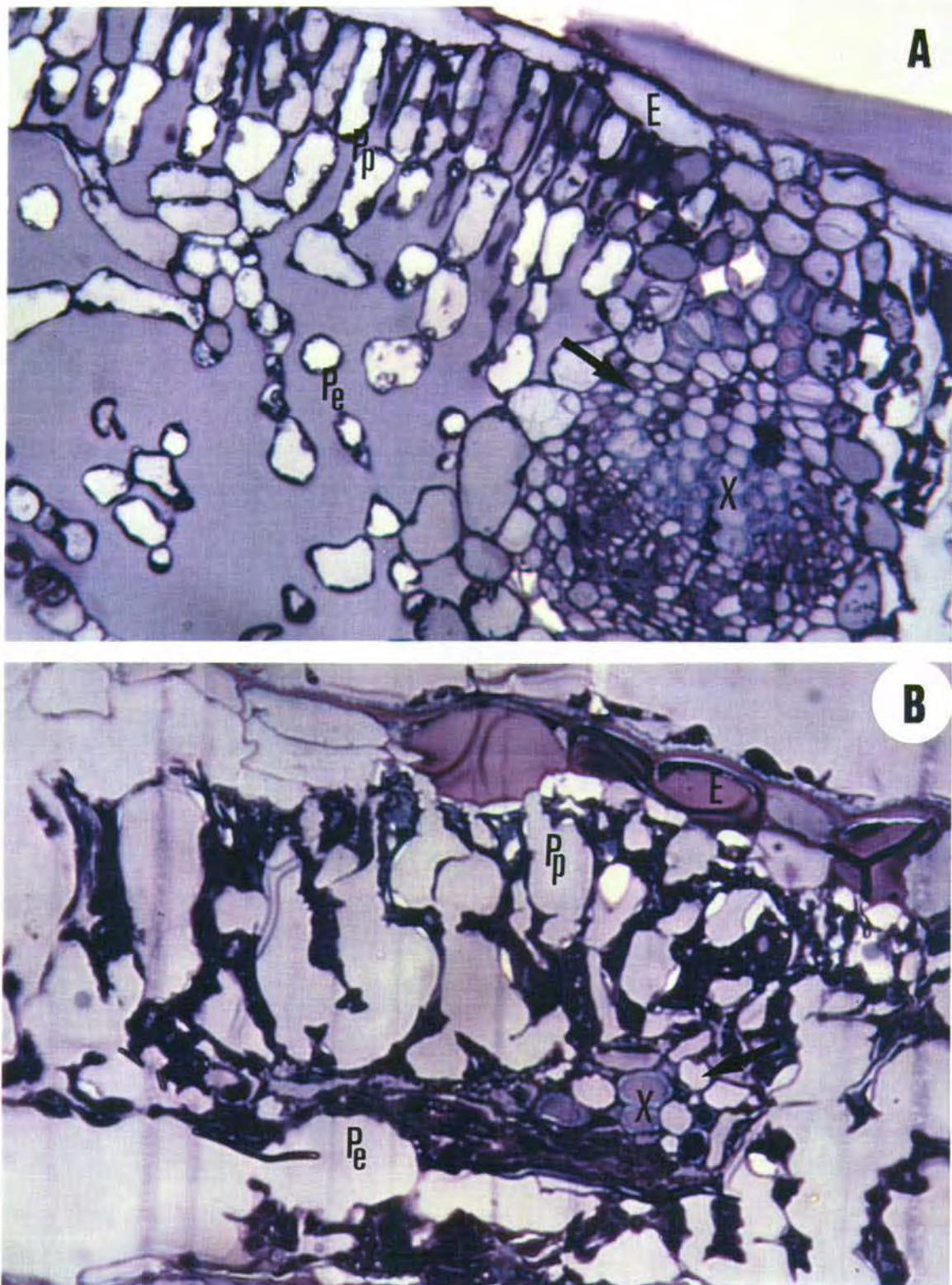
#### **4.5. Canvis estructurals en els teixits de fulles de perera durant la interacció**

Es va observar l'estructura interna dels teixits de fulles de perera infiltrats amb els bacteris a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, a les 48 hores de les inoculacions. La modificació de l'estructura dels teixits de la fulla en la zona infiltrada amb els bacteris va ser diferent en cada una de les situacions.

##### *Observacions al microscopi òptic*

En les observacions realitzades al microscopi òptic es va apreciar que els canvis més importants van produir-se en les cèl·lules del mesofil·le de la fulla. Tant en la situació compatible com en la incompatible l'epidermis mantenia la seva estructura, en canvi l'estructura del parènquima s'havia alterat (Figura 1.21). En la situació compatible (Figura 1.21 A) el parènquima en palissada mantenia íntegra l'estructura, mentre que el parènquima esponjós estava desorganitzat, les cèl·lules quedaven separades, deixant de formar un teixit continu. Tot i això, les cèl·lules del parènquima esponjós mantenien la seva morfologia, limitades per la paret cel·lular.

En la situació incompatible (Figura 1.21 B), el mesofil·le de la zona inoculada va perdre la seva estructura. Tant el parènquima en palissada com el parènquima esponjós es van desorganitzar. Es va observar que les cèl·lules havien perdut la seva estructura i que el mesofil·le quedava format per espais limitats per agregats cel·lulars. Els feixos vasculars en la situació compatible van mantenir la seva organització, mentre que en la incompatible també van perdre l'estructura, observant-se per l'interior del mesofil·le cèl·lules aïllades del xilema. En les zones no inoculades amb bacteris i en les infiltrades amb aigua destil·lada estèril no es van observar canvis en l'estructura dels teixits.



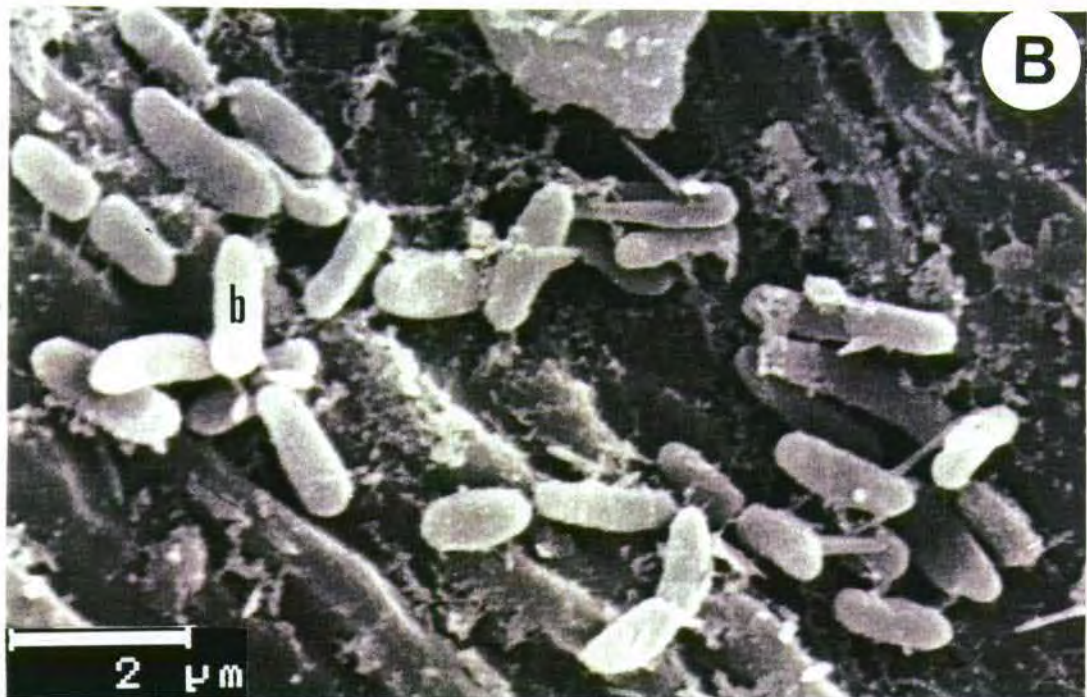
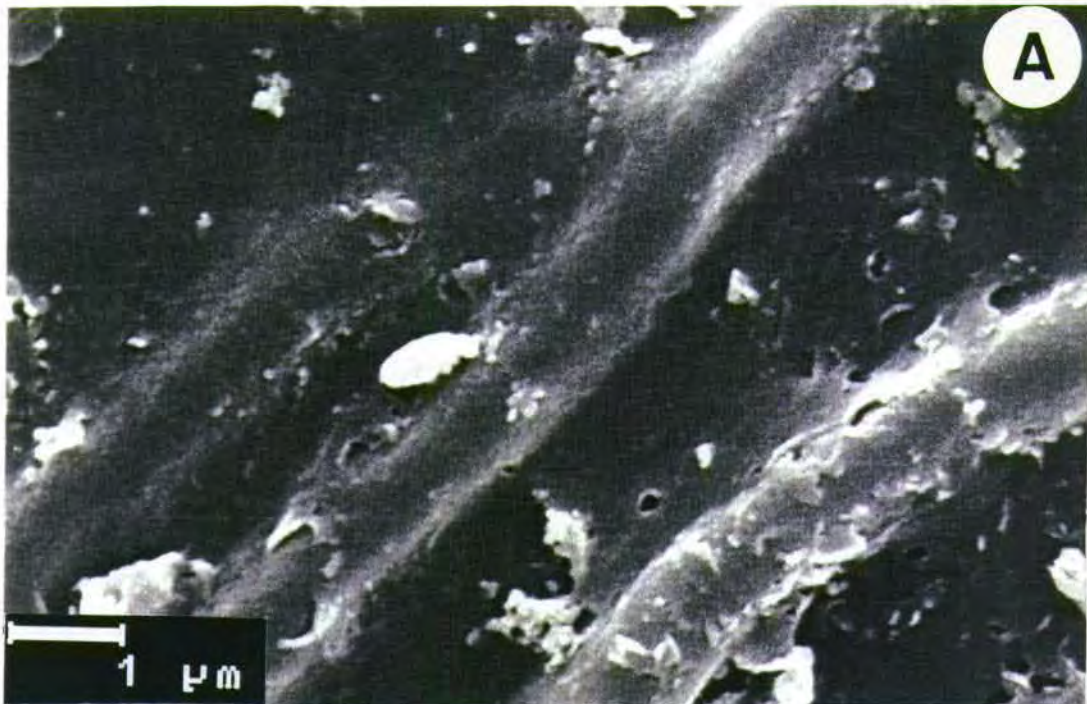
**Figura 1.21.** Talls transversals semifins de fulles de plantes de perera de la varietat Conference realitzats a les 48 hores de la inoculació per microinfiltració dels bacteris (A) *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 (interacció compatible) i (B) *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 (interacció incompatible). Observació al microscopi òptic dels teixits de la zona infiltrada amb els bacteris (X 428). Tinció amb blau de metilè (solució aquosa al 0.5%); E=epidermis de l'anvers de la fulla; Pp=parènquima en palissada; Pe=parènquima esponjós; fletxa=teixits conductors; X=xilema.

*Observacions al microscopi electrònic de rastreig*

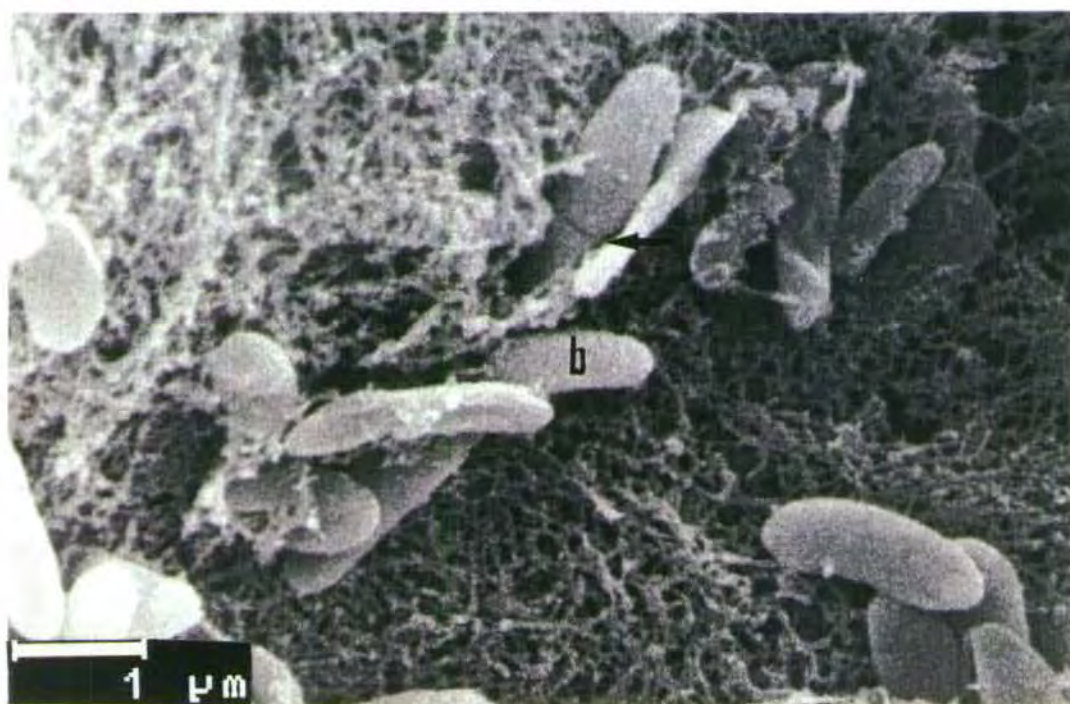
Al microscopi electrònic de rastreig es va observar la localització dels bacteris infiltrats en la interacció compatible i incompatible (Figures 1.22, 1.23 i 1.24).

*P. syringae* pv. *syringae* EPS94 va colonitzar i es va multiplicar en l'espai intercel·lular de la zona inoculada de les fulles (Figures 1.22 B, 1.23). Fora de la zona d'inoculació no es van observar bacteris en les 48 primeres hores de la interacció (Figura 1.22 A). *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68, en canvi, a les 48 hores d'inoculació va quedar restringit a una zona molt reduïda de l'espai intercel·lular del voltant del punt d'inoculació (Figura 1.24). En les fulles infiltrades amb aigua destil·lada estèril no es van observar bacteris. Tampoc es van observar bacteris ni alteracions en els teixits fora de la zona d'inoculació en les fulles infiltrades amb els dos bacteris.

En l'espai intercel·lular del mesofil·le de les fulles corresponent a la zona infiltrada amb els bacteris es va observar un elevat nombre de bacteris en la situació compatible (*P. syringae* pv. *syringae* EPS94), fins i tot amb cèl·lules bacterianes en divisió. En la situació incompatible (*P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68), en canvi, es van observar poques cèl·lules bacterianes en l'espai intercel·lular del mesofil·le de la zona infiltrada. En aquesta interacció es va observar la formació d'unes estructures fusiformes, fibril·lars, formant agregats molt densos que ocupaven l'espai intercel·lular dels teixits infiltrats amb els bacteris (Figura 1.24). Aquestes estructures no es van observar en les fulles infiltrades amb el patogen de perera, ni en les infiltracions amb aigua destil·lada estèril.



**Figura 1.22.** Micrografies al microscopi electrònic de rastreig de la superfície de fulles de plantes de perera de la varietat Conference a les 48 hores de la inoculació per microinfiltració amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. **A**, Epidermis del revers de la fulla fora de la zona d'inoculació dels bacteris. **B**, Epidermis del revers de la fulla en el punt d'inoculació. Es pot observar la presència de bacteris (b) en la superfície foliar.



**Figura 1.23.** Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil·le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 (interacció compatible). Les imatges corresponen al punt d'infiltració dels bacteris. Observi's la presència en l'espai intercel·lular de cèl·lules bacterianes (b), algunes de les quals estan en divisió (fletxa), i l'establiment de contacte directe amb la superfície de les cèl·lules vegetals.



**Figura 1.24.** Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil·le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 (interacció incompatible). Les imatges corresponen al punt d'infiltració dels bacteris. Observi's la presència en l'espai intercel·lular d'agregats fusiformes (Af) recobrint la superfície externa de les cèl·lules parenquimàtiques i alguna cèl·lula bacteriana (b).

*Observacions al microscopi electrònic de transmissió*

En les micrografies electròniques dels teixits de fulla de perera a les 48 hores de la infiltració d'aigua estèril (Figura 1.25), es van observar les cèl·lules del mesofil·le de la fulla formant un teixit continu ben organitzat. Les cèl·lules parenquimàtiques estaven turgents i mantenien la seva estructura, amb la paret cel·lular limitada internament per la membrana plasmàtica, el citoplasma era poc electrodens i s'hi observaven cloroplasts, mitocondris, grans vacuols i les vesícules de Golgi, entre altres estructures cel·lulars. Els cloroplasts estaven limitats per la membrana, amb estroma i els grana ben organitzats, amb presència de grànuls de midó i de grànuls osmiofílics. El tonoplast i el plasmalemma eren continus i ben diferenciats. En l'espai intercel·lular no s'hi observaven bacteris ni estructures fibril·lars o granulars electrodenses.

Les micrografies electròniques dels teixits de fulla de perera infiltrats amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> (situació compatible), a les 48 hores de la inoculació, van mostrar, la presència de bacteris en l'espai intercel·lular del parènquima de la zona infiltrada (Figura 1.26). Les cèl·lules bacterianes es trobaven properes a la superfície externa de la paret cel·lular vegetal, observant-se la interacció bacteri-planta a través de la paret cel·lular vegetal i la superfície bacteriana (Figura 1.27). En la cara externa de la paret cel·lular de les cèl·lules parenquimàtiques que tenien bacteris propers es van observar estructures granulars electrodenses, les quals no s'observaven en zones que no tenien bacteris a prop (Figura 1.27). En la superfície dels bacteris es van observar unes estructures globulars electrodenses distribuïdes radialment per la superfície, en alguns casos formant cadenes, originades, semblava, a partir de la membrana externa. En algunes de les micrografies es podia observar l'establiment de contacte físic entre els dos tipus d'estructures granulars electrodenses (de les cèl·lules de la planta i del bacteri) i en altres el contacte bacteri-planta era directe, a través de les parets cel·lulars respectives. Algunes cèl·lules bacterianes es trobaven en divisió.

Pel que fa a l'estructura dels teixits de fulla de perera en la zona infiltrada amb el patogen, es va observar una desorganització en les cèl·lules parenquimàtiques, més intensa en el punt d'inoculació (inici de les lesions i necrosis). En la zona d'inici de les infeccions es van observar canvis forts en l'organització cel·lular. El citoplasma de les cèl·lules parenquimàtiques era més electrodens, no s'observaven vacuols, i els orgànuls citoplasmàtics havien perdut l'estructura. Els cloroplasts havien perdut la membrana i l'estroma i els grana estaven dispersos pel citoplasma juntament amb els grànuls de midó (Figura 1.26). En algunes cèl·lules infectades es va observar el trencament de la paret

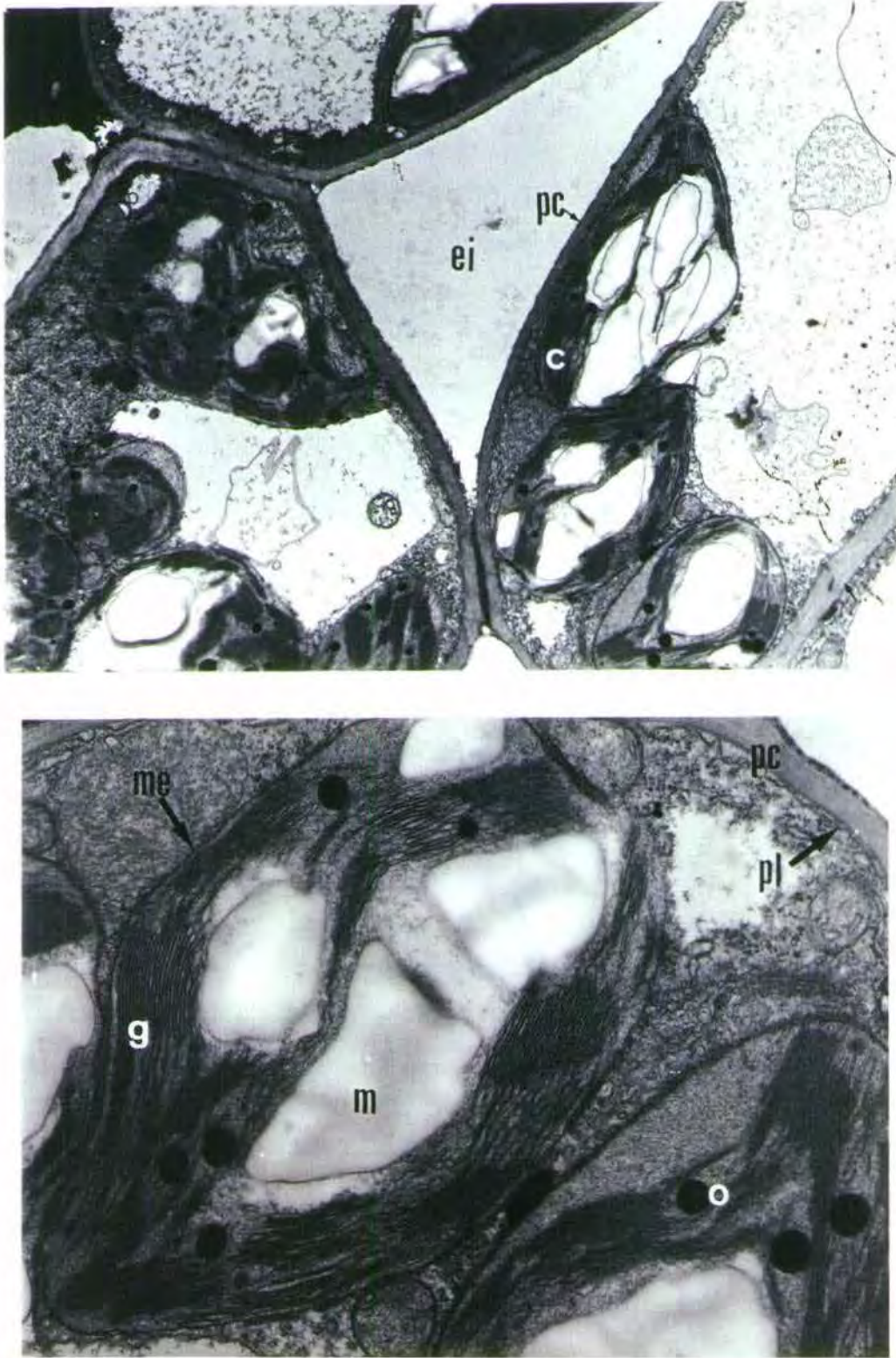
cel·lular i l'abocament del contingut citoplasmàtic a l'espai intercel·lular, amb la conseqüent mort cel·lular. En zones més allunyades del punt d'infiltració dels bacteris, tot i observar-se cèl·lules bacterianes en l'espai intercel·lular, les cèl·lules del parènquima estaven menys desorganitzades, s'observaven agregats citoplasmàtics en l'interior de les cèl·lules, però tant el citoplasma com els cloroplasts encara eren poc electrodensos.

En les micrografies electròniques de teixits de fulla de perera infiltrats amb *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> (situació incompatible), a les 48 hores de la inoculació, es va observar la presència de bacteris en l'espai intercel·lular de les cèl·lules parenquimàtiques (Figura 1.28). En general s'observaven agregats de bacteris entre les cèl·lules vegetals, limitats o envoltats per una matriu fibril·lar. Les cèl·lules bacterianes eren menys electrodenses que en la situació compatible. No es van observar estructures granulars electrodenses en la superfície externa de les cèl·lules vegetals ni en la superfície dels bacteris.

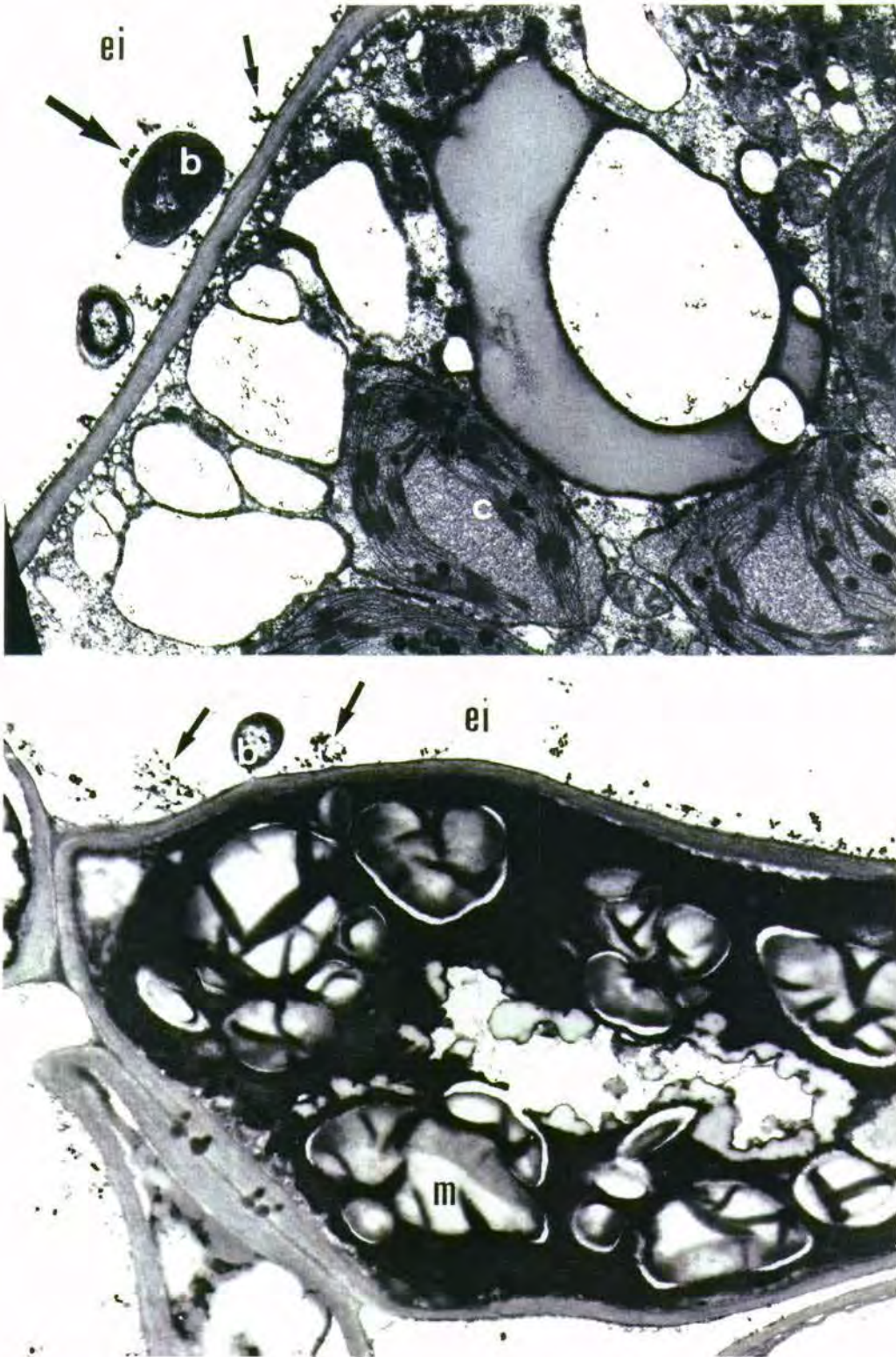
En la interacció incompatible, en les cèl·lules del mesofil·le de la fulla que tenien bacteris propers es van observar forts canvis: el citoplasma era més electrodens, el plasmalemma i el tonoplast van perdre la continuïtat i els orgànuls cel·lulars van desestructurar-se. L'estroma i la membrana dels cloroplasts van desaparèixer. Algunes cèl·lules vegetals van abocar el contingut al medi extracel·lular, observant-se grànuls de midó i agregats cel·lulars en l'espai intercel·lular, envoltant els bacteris. Les cèl·lules vegetals afectades havien perdut la turgència, ja que el plasmalemma quedava separat de la paret. En la cara interna de la paret cel·lular es va observar la deposició d'estructures granulars o fibroses electrodenses (Figura 1.28).

En tots els tractaments, fora de la zona infiltrada amb bacteris no es van observar canvis o alteracions en els teixits i cèl·lules de les fulles.

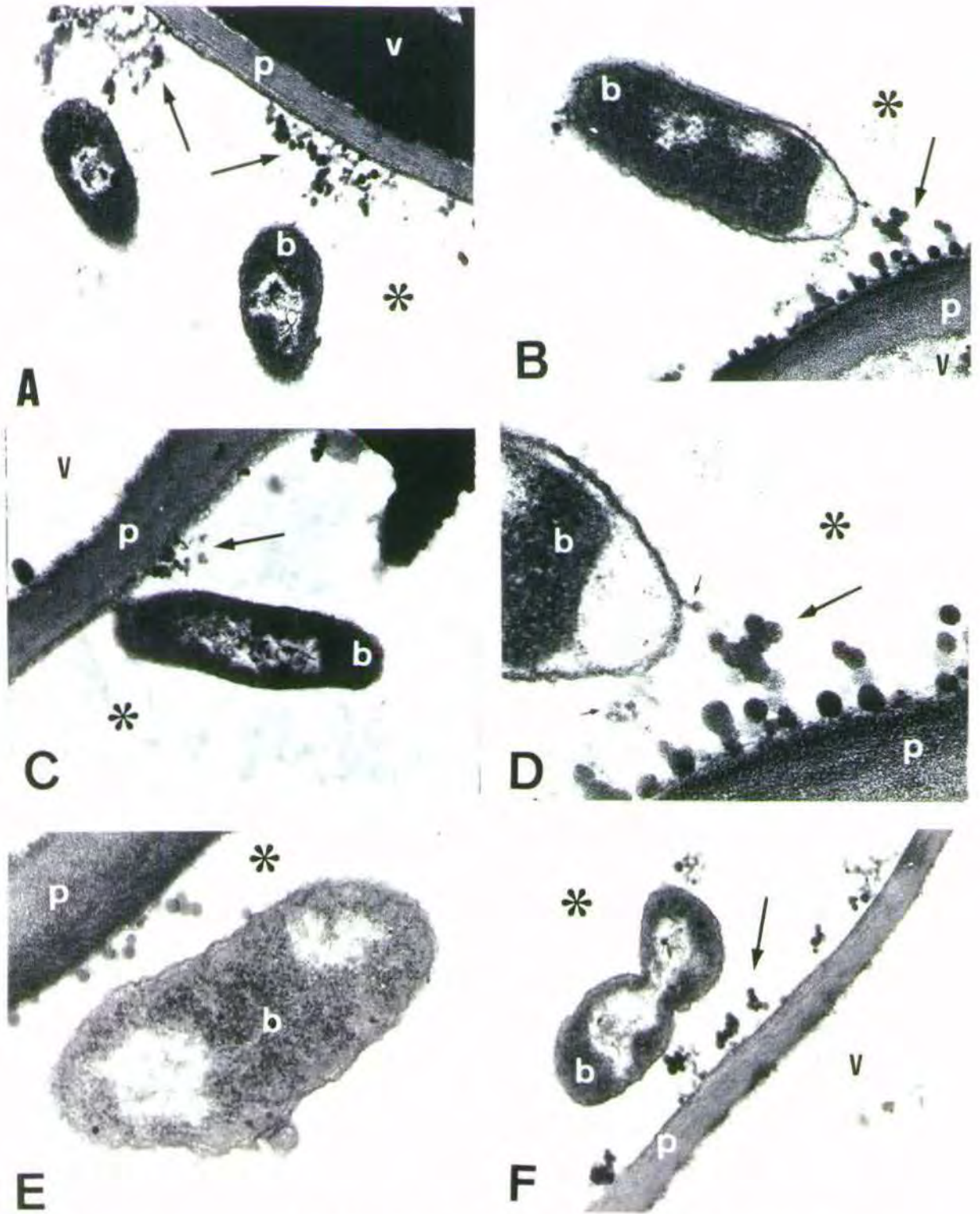




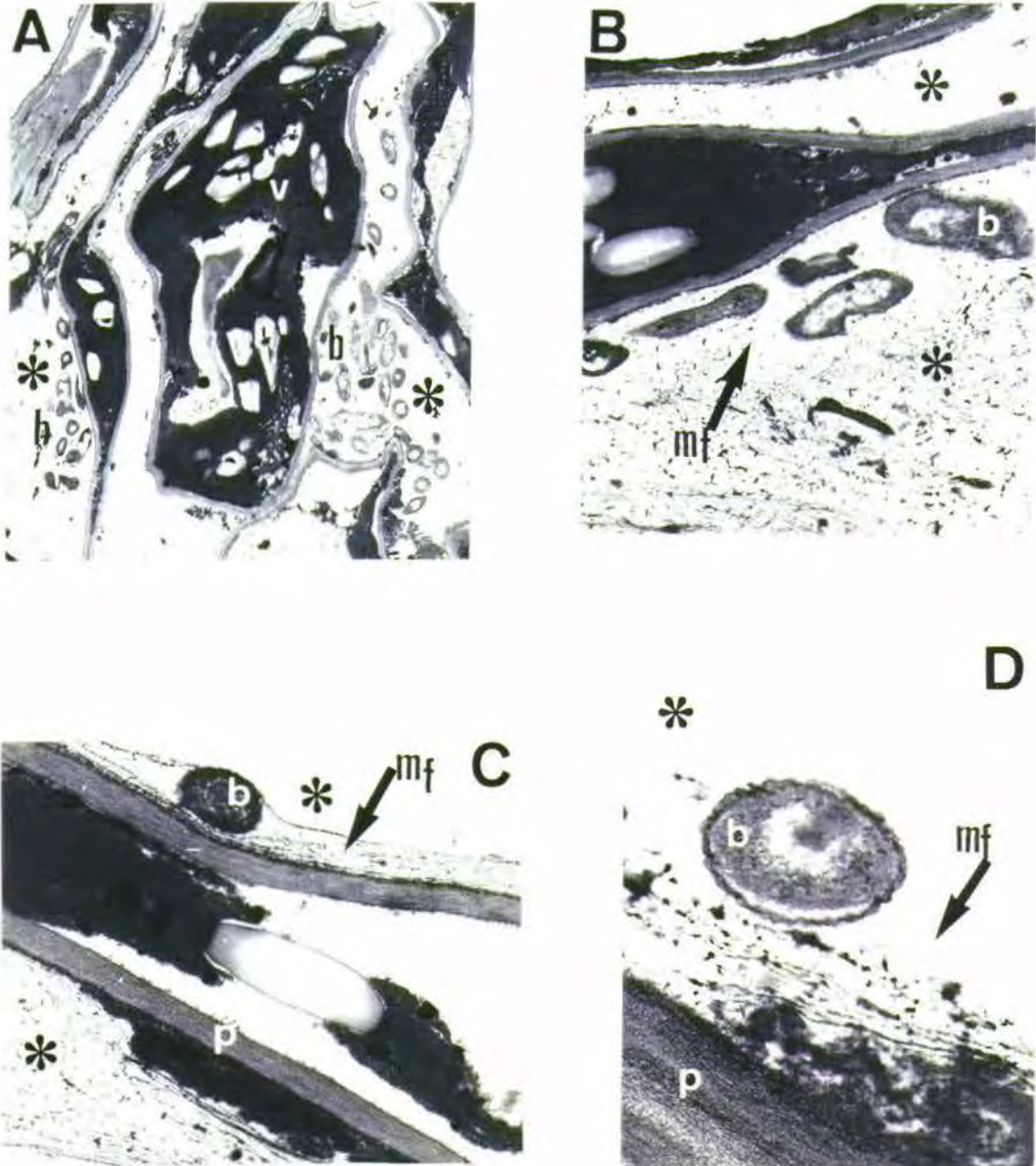
**Figura 1.25.** Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulles de perera infiltrades amb aigua destil·lada estèril. **Superior**, cèl·lules parenquimàtiques del mesofil·le de la fulla (X 8500). Observi's l'estructura regular del teixit (cèl·lules turgents, en contacte les unes amb les altres). En l'espai intercel·lular (ei) no s'observen bacteris ni estructures granulars electrodenses. **Inferior**, detall d'una cèl·lula parenquimàtica en la que es pot observar l'organització cel·lular, amb el plasmalemma (pl) continu i proper a la paret cel·lular (pc) i els cloroplasts (c) limitats per la membrana externa (me) amb els grana (g) apilats regularment i amb grànuls de midó (m) en el seu interior. En l'interior dels cloroplasts s'observen grànuls osmiofílics (o) (X 27000).



**Figura 1.26.** Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulles de perera infiltrades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 (compatible). Observi's la presència de bacteris (b) en l'espai intercel.lular (ei) del parènquima, i d'estructures granulars electrodenses (fletxes) en la superfície externa de la paret cel.lular vegetal, properes als bacteris. **Superior**, cèl.lula parenquimàtica propera al punt d'inoculació. Inici de pèrdua de l'organització cel.lular, tot i que encara es manté l'estructura dels cloroplasts (c) (X 13500). **Inferior**, detall d'una cèl.lula parenquimàtica del punt d'inoculació. Pèrdua de l'estructura cel.lular, citoplasma més electrodens, desaparició de la membrana dels cloroplasts i de l'estroma i grànuls de midó (m) repartits pel citoplasma ( X 10600).



**Figura 1.27.** Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulles de perera infiltrades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 (compatible). Detall de la interacció bacteri-cèl.lula vegetal en l'espai intercel.lular (\*). A, (X 25000) observi's la localització dels bacteris (b) propers a la paret cel.lular vegetal (p) i la presència d'estructures granulars electrodenses (fletxa gran) en la superfície externa de la paret cel.lular. A les micrografies B (X 40000) i D (X 80000) s'observen estructures granulars de tamany inferior (fletxa petita) en la superfície de les cèl.lules bacterianes. C, contacte directe bacteri-cèl.lula vegetal (v) (X 25000). A les micrografies E (X 50000) i F (X 25000) s'observen cèl.lules bacterianes en divisió.

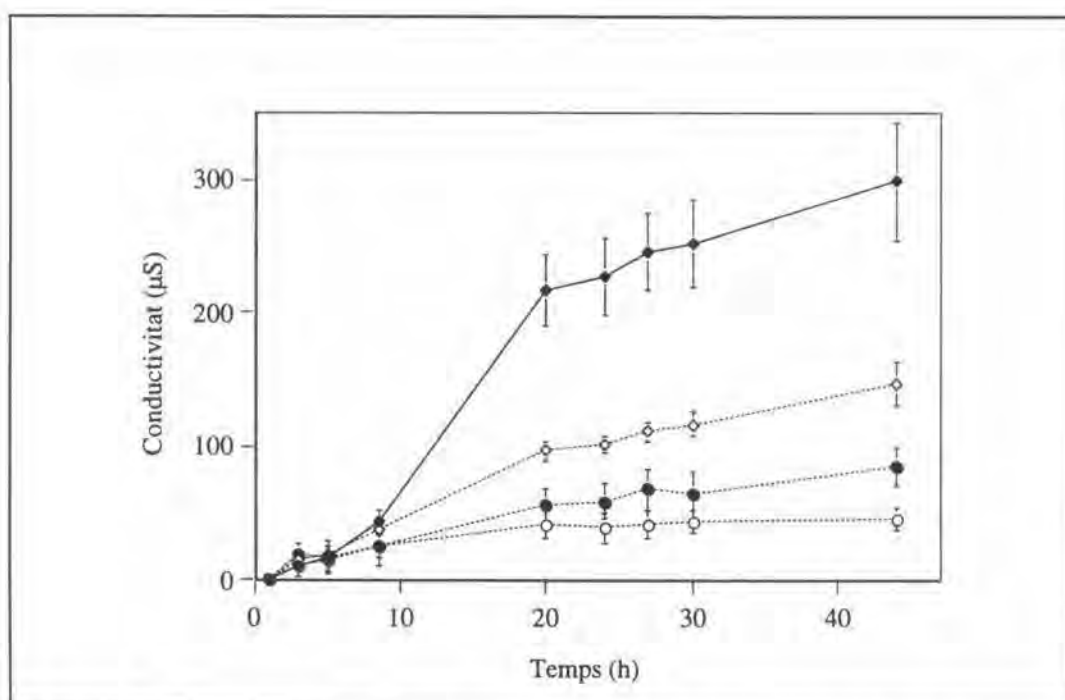


**Figura 1.28.** Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulles de perera infiltrades amb *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 (interacció incompatible) 48 hores després de la infiltració. **A**, observi's la localització dels bacteris en l'espai intercel·lular (\*), formant agregats que queden limitats per les parets cel·lulars (p) de cèl·lules vegetals veïnes (X 5000). Les cèl·lules vegetals (v) en contacte amb bacteris han perdut l'estructura (citoplasma més electrodens, i desaparició de l'estroma i de la membrana externa dels cloroplasts). **B** (X 16000), **C** (X 25000), i **D** (X 63000), bacteris en contacte amb les cèl·lules vegetals envoltats per una matriu fibril·lar (mf).

#### 4.6. Canvis en la permeabilitat cel·lular dels teixits de fulla de perera durant la interacció amb *P. syringae*

Es van mesurar els canvis en la permeabilitat dels teixits de fulla de perera durant la interacció amb bacteris fitopatògens virulents, en la situació compatible (*P. syringae* pv. *syringae* 2027.37), en la incompatible (*P. syringae* pv. *tabaci* 2106), i en la interacció amb un patogen avirulent (*P. syringae* pv. *syringae* 2831). Com a control es van mesurar els canvis en la permeabilitat cel·lular en teixits de fulla no infiltrats amb bacteris.

A la Figura 1.29 es representa la conductivitat al llarg del temps en discs de fulla de plantes de perera de la varietat Passe Crassane infiltrats amb els bacteris. S'ha representat l'increment de conductivitat respecte la inicial, ja que els valors inicials de conductivitat van ser similars per tots els tractaments (100-150  $\mu$ S). El nombre de bacteris infiltrats va ser d'entre  $5 \times 10^6$  i  $3 \times 10^7$  ufc disc<sup>-1</sup>, pels diferents tractaments.



**Figura 1.29.** Efecte del tipus d'interacció i la virulència del bacteri en la sortida d'electròlits. Discs de fulles de perera de la varietat Passe Crassane infiltrats amb *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37 (◆, virulent, situació compatible); *P. syringae* pv. *syringae* 2831, (●, avirulent); i *P. syringae* pv. *tabaci* 2106, (◇, virulent, situació incompatible). Les incubacions es van efectuar en amortidor MES 0.5 mM+ CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM (5 discs de fulla en 10 ml d'amortidor per repetició) a 25°C amb llum i agitació. Com a control es van infiltrar discs amb amortidor (○). Per cada tractament es van realitzar quatre repeticions. Cada valor correspon a la mitjana de l'increment de conductivitat respecte la conductivitat inicial de les quatre repeticions. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana.

Durant les 8 primeres hores d'incubació els canvis en la permeabilitat cel·lular van ser similars en les diferents situacions (compatible i incompatible) i segons la virulència bacteriana (Figura 1.29). Durant aquest període de temps no es va observar un augment important de la sortida d'electròlits. A partir de les 10 hores d'incubació el comportament va ser diferent en funció del tipus d'interacció. En la situació compatible (*P. syringae* pv. *syringae* 2027.37) es va produir un ràpid i fort augment de la conductivitat. Durant les 20 primeres hores d'incubació es van assolir valors de conductivitat elevats, que van continuar augmentant fins al final de la incubació. En aquest tractament es van obtenir els valors de conductivitat més elevats (300  $\mu$ S). En la situació incompatible (*P. syringae* pv. *tabaci* 2106) es va produir un augment lent i progressiu de la conductivitat, assolint valors al final de la incubació inferiors als de la situació compatible (100  $\mu$ S). Amb la soca avirulenta *P. syringae* pv. *syringae* 2831 els valors de conductivitat al llarg de tota la incubació es van mantenir força estables i van ser similars als del control (discs no infiltrats amb bacteris).

#### 4.6.1. Efecte del tipus d'interacció en la capacitat final de sortida d'electròlits dels teixits de fulla de perera

Les variàncies de la conductivitat al final de la incubació pels diferents tractaments es van mostrar homogènies segons la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.056$ ) i els residus van presentar una distribució normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.89$ ,  $(P<W)=0.064$ ). L'anàlisi de la variància va mostrar un efecte significatiu del tipus de bacteri infiltrat en la conductivitat al final de la incubació ( $(P>F) <0.001$ ,  $R^2=0.94$ ).

**Taula 1.29.** Efecte del tipus d'interacció en la sortida d'electròlits de discs de fulla de plantes de perera infiltrats amb diferents bacteris

<i>Bacteri infiltrat</i> <sup>a</sup>	<i>Interacció</i>	<i>Conductivitat</i> <sup>b</sup> ( $\mu$ S)
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37 (virulent)	Compatible	298 a
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (virulent)	Incompatible	147 b
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831 (avirulent)	-	85 c
Control no inoculat	-	46 c

<sup>a</sup> Es van infiltrar discs de fulles de plantes de perera de la varietat Passe Crassane amb suspensions bacterianes. Per cada tractament es van realitzar quatre repeticions amb 5 discs de fulla per repetició. Els discs de cada repetició es van incubar en 10 ml d'amortidor MES 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM durant 44 h a 25°C amb llum i agitació

<sup>b</sup> Es va mesurar la conductivitat de les solucions al final de la incubació. Els valors corresponen a la mitjana de la conductivitat de les quatre repeticions de cada tractament. Valors de conductivitat seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives d'acord amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ). L'anàlisi de la variància va mostrar un efecte significatiu del tractament ( $(P>F)<0.001$ ,  $R^2=0.94$ )

La conductivitat al final de la incubació dels discs de fulla infiltrats amb la soca virulenta (situació compatible) va ser significativament superior a la de la situació incompatible i a la de la soca avirulenta. En la situació incompatible amb *P. syringae* pv. *tabaci* 2106 es van obtenir valors de conductivitat al final de la incubació significativament superiors als de la soca avirulenta *P. syringae* pv. *syringae* 2831. Per aquesta última la conductivitat final no va ser significativament diferent de la dels controls no infiltrats amb bacteris (Taula 1.29).

#### 4.6.2. Determinació dels paràmetres cinètics i bondat de l'ajust

A la Taula 1.30 es mostren els valors dels paràmetres  $K_0$  i  $b$  de l'equació descrita a la pàg. 52 per cada una de les repeticions dels diferents tractaments. En tots els tractaments, el model monomolecular amb taxa de sortida d'electròlits variable en el temps es va ajustar adequadament a les dades de sortida d'electròlits al llarg del temps. Com a conductivitat màxima ( $C_{max}$ ) es va utilitzar la mitjana de la conductivitat dels diferents tractaments després de la congelació i descongelació de les mostres (294  $\mu$ S).

**Taula 1.30.** Paràmetres i ajust del model matemàtic utilitzat per definir la cinètica de sortida d'electròlits en discs de fulles de plantes de perera infiltrats amb diversos bacteris

Bacteri <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Paràmetres		$R^2$	$P>F$	Residus	
		$K_0$	$b$			$W$	$P<W$
<i>P.s.pv. syringae</i> 2027.37	1	0.0031	-0.0055	0.99	0.0000	0.957	0.7656
<i>P.s.pv. syringae</i> 2027.37	2	0.0010	-0.0047	0.99	0.0000	0.941	0.5762
<i>P.s.pv. syringae</i> 2027.37	3	0.0169	-0.0092	0.99	0.0000	0.888	0.1857
<i>P.s.pv. syringae</i> 2027.37	4	-0.0018	-0.0060	0.99	0.0000	0.942	0.5999
<i>P.s.pv. tabaci</i> 2106	1	0.0192	0.0003	0.98	0.0000	0.850	0.0753
<i>P.s.pv. tabaci</i> 2106	2	0.0194	0.0003	0.99	0.0000	0.993	0.9984
<i>P.s.pv. tabaci</i> 2106	3	0.0210	-0.0003	0.99	0.0000	0.904	0.2772
<i>P.s.pv. tabaci</i> 2106	4	0.0186	0.0002	0.97	0.0000	0.906	0.2851
<i>P.s.pv. syringae</i> 2831	1	0.0126	0.0002	0.91	0.0001	0.964	0.8382
<i>P.s.pv. syringae</i> 2831	2	0.0051	-0.0001	0.78	0.0016	0.892	0.2041
<i>P.s.pv. syringae</i> 2831	3	0.0227	0.0004	0.99	0.0000	0.966	0.8526
<i>P.s.pv. syringae</i> 2831	4	0.0125	0.0002	0.98	0.0000	0.984	0.9781
Control	1	0.0072	0.0002	0.97	0.0000	0.888	0.1531
Control	2	0.0067	0.0002	0.96	0.0000	0.939	0.5617
Control	3	0.0135	0.0004	0.96	0.0000	0.875	0.1367
Control	4	0.0139	0.0004	0.93	0.0000	0.920	0.3879

<sup>a</sup> Es van infiltrar discs de fulles de plantes de perera de la varietat Passe Crassane amb suspensions d' $1 \times 10^9$  ufc ml<sup>-1</sup> de les diferents soques. Com a control es van infiltrar discs amb amortidor

<sup>b</sup> Per cada una de les repeticions de cada tractament es van obtenir, per regressió no lineal, els paràmetres  $K_0$  i  $b$  del model matemàtic i es va calcular el coeficient de determinació ( $R^2$ ), el grau de significació ( $P>F$ ) i la normalitat dels residus (prova de Shapiro-Wilk)

#### 4.6.3. Anàlisi estadística de l'efecte del tipus d'interacció bacteri-perera en la taxa de sortida d'electròlits

Per determinar l'efecte dels tractaments es van comparar els paràmetres  $K_0$  i  $b$  del model, que defineixen la taxa de sortida d'electròlits ( $K$ ) al llarg del temps (Equació 4 pàg. 51).

Les variàncies dels valors de  $K_0$  i  $b$  dels diferents tractaments es van mostrar homogènies segons la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.065$  i  $(P>F)=0.070$ , respectivament) i els residus es van distribuir de forma normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.95$ ,  $(P<W)=0.509$  i  $W=0.90$ ,  $(P<W)=0.170$ , respectivament). L'anàlisi de la variància va indicar un efecte significatiu del tractament (tipus de bacteri infiltrat) en cada un dels paràmetres que defineixen la taxa de sortida d'electròlits ( $(P>F)=0.001$ ,  $R^2=0.72$  i  $(P>F)<0.001$ ,  $R^2=0.88$ , respectivament).

Els valors dels paràmetres en la situació compatible (soca virulenta) van ser significativament diferents dels de la situació incompatible i dels de la soca avirulenta (Taula 1.31). En la situació compatible es van obtenir valors de  $K_0$  majoritàriament positius i de  $b$  negatius. En les altres situacions (*P. syringae* pv. *syringae* 2831 i *P. syringae* pv. *tabaci* 2106) es van obtenir valors positius pels dos paràmetres, no significativament diferents dels obtinguts en els discs no infiltrats amb bacteris.

**Taula 1.31.** Efecte del tipus d'interacció bacteri-perera en la taxa de sortida d'electròlits de discs de fulla infiltrats amb diferents bacteris

Bacteri (virulència) <sup>a</sup>	Interacció	Paràmetres <sup>b</sup>	
		$K_0$	$b$
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37 (V)	Compatible	0.0048 b	-0.0063 b
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (V)	Incompatible	0.0195 a	0.0001 a
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831 (AV)	-	0.0132 a	0.0002 a
Control no infiltrat amb bacteris	-	0.0103 a	0.0003 a

<sup>a</sup> Virulència de la soca V: virulenta, AV: avirulenta  
<sup>b</sup>  $K_0$  i  $b$  són la mitjana dels valors obtinguts en les quatre repeticions de cada tractament. Valors d'un paràmetre seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ). L'anàlisi de la variància va indicar un efecte significatiu del tractament en el valor de  $K_0$  i  $b$  ( $(P>F)=0.001$ ,  $R^2=0.72$  i  $(P>F)<0.001$ ,  $R^2=0.88$ , respectivament)



#### 4.6.4. Anàlisi estadística de l'efecte del tipus d'interacció bacteri-perera en el temps de pèrdua mitjana d'electròlits ( $t_{50}$ )

A partir de les equacions obtingudes en l'ajust dels valors de conductivitat al llarg del temps (Taula 1.30) es va calcular el temps necessari per assolir valors de conductivitat del 50% de la conductivitat màxima ( $t_{50}$ ).

En els discs de fulla infiltrats amb la soca avirulenta *P. syringae* pv. *syringae* 2831 i en els discs no infiltrats el temps necessari per assolir el 50% de la conductivitat màxima va ser superior al temps d'incubació de l'experiment. En els infiltrats amb les soques virulentes (situacions compatible i incompatible) es van obtenir valors de  $t_{50}$  inferiors (Taula 1.32 ).

Es va realitzar la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer per comparar els valors de  $t_{50}$  en les infiltracions amb bacteris fitopatògens virulents en les situacions compatible i incompatible (Taula 1.32). Els valors de  $t_{50}$  dels dos tractaments van presentar les variàncies homogènies segons la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.3045$ ) i els residus es van distribuir de forma normal ( $W=0.95$ ,  $(P<W)=0.754$ ). L'anàlisi de la variància va mostrar un efecte significatiu del tipus d'interacció bacteri-perera en el temps de pèrdua mitjana d'electròlits ( $(P>F)<0.001$ ,  $R^2=0.95$ ). El temps de pèrdua mitjana d'electròlits en la situació compatible va ser significativament inferior (15 h) al de la situació incompatible (30 h).

**Taula 1.32.** Efecte del tipus d'interacció bacteri-perera en el  $t_{50}$  en discs de fulla de plantes de perera de la varietat Passe Crassane infiltrats amb diferents bacteris

<i>Bacteri</i>	<i>Interacció</i>	$t_{50}^{\pm}$ (hores)
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37 (virulent)	Compatible	15.51 b
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (virulent)	Incompatible	29.31 a
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831 (avirulent)	-	>50
Control no infiltrat	-	>50

<sup>±</sup> Els valors de  $t_{50}$  (temps necessari per a la sortida del 50% de la quantitat màxima d'electròlits) es van estimar a partir de les equacions obtingudes per cada repetició dels diferents tractaments. Cada valor és la mitjana de les repeticions de cada tractament. Valors seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ). Els tractaments en que es van obtenir  $t_{50}$  superiors a la durada de l'experiment no es van incloure en la separació de mitjanes. L'anàlisi de la variància va indicar un efecte significatiu del tractament en el  $t_{50}$  ( $(P>F)<0.001$ ,  $R^2=0.95$ )

## DISCUSSIÓ

### 1. Factors que afecten la interacció *P. syringae* pv. *syringae* - perera

#### 1.1. Efecte de la temperatura

La temperatura òptima per a la infecció i desenvolupament de la malaltia causada per *P. syringae* pv. *syringae* en fulles de perera en condicions controlades (humitat relativa superior al 90% i fotoperíode de 16 hores llum) es situa entre 20 i 25 °C. A temperatures inferiors (15°C) i superiors (30°C) s'han obtingut nivells de severitat inferiors. A la temperatura òptima, a les 48 hores de la inoculació s'observen necrosis progressives per la superfície de la fulla. A 15 i 30 °C tot i produir-se infeccions, aquestes progressen poc per la superfície de la fulla. Això fa pensar que, en l'interval de temperatures avaluades, la temperatura afecta més el desenvolupament de la malaltia i la velocitat d'expressió dels símptomes que la infecció. Això pot ser explicat pel fet que la incubació de material vegetal inoculat amb el patogen a la temperatura òptima per a la multiplicació, permet al patogen assolir nivells poblacionals elevats en poc temps i els símptomes macroscòpics de les infeccions s'observen abans que en incubacions a temperatures fora de l'interval òptim. Resultats similars van ser observats per *E. amylovora* en perera (Brisset, 1990), en que la temperatura també afecta principalment la velocitat d'expressió dels símptomes.

La temperatura òptima pel desenvolupament de la malaltia obtinguda en aquest treball coincideix amb la temperatura òptima pel creixement i multiplicació de *P. syringae* pv. *syringae* en brou nutritiu, ja que el màxim creixement i multiplicació es produeix a temperatures d'entre 25-28°C (Hirano i Upper, 1990). A més, l'òptim de temperatura pel desenvolupament de la malaltia en condicions controlades es situa dins l'interval òptim per a la patogènia de *P. syringae*, corresponent a temperatures de 15 a 27°C (Dye, 1956), i per a la producció de la toxina siringomicina (Siden i col., 1971).

Els factors ambientals, entre ells la temperatura, tenen un efecte important en el desenvolupament de la malaltia per *P. syringae* pv. *syringae* en perera. En general, els mateixos factors ambientals que afecten el desenvolupament de la malaltia en condicions

naturals (comentats en la introducció general), tenen efecte en condicions controlades. Tot i això, la temperatura òptima determinada en aquest treball per a la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera és superior a la temperatura òptima pel creixement i multiplicació del patogen i pel desenvolupament d'infeccions i de la malaltia en condicions naturals. En condicions naturals la multiplicació de *P. syringae* pv. *syringae* en perera i la manifestació dels símptomes de la malaltia es donen a temperatures d'entre 12 i 15°C, no superiors a 20°C (Calzolari i col., 1992). A les comarques de Girona, en plantacions comercials de perera, el màxim nivell poblacional de *P. syringae* pv. *syringae* coincideix amb temperatures mitjanes suaus (10-15°C) i pluviometries elevades, corresponents a la primavera, període en el qual el temps de duplicació de la població és d'un dia (Montesinos i col., 1987).

La diferència en la temperatura òptima per a la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en condicions naturals i en condicions controlades es pot explicar pel fet que en condicions naturals per a que es produeixin infeccions i es desenvolupi la malaltia han de coincidir diversos factors com que l'hoste estigui en estat susceptible, que el patogen estigui en estat infectiu i que les condicions ambientals siguin favorables. Els moments en que la perera és susceptible a les infeccions de *P. syringae* pv. *syringae* són la tardor i principalment la primavera, coincidint en aquest cas amb l'aparició de teixits joves i òrgans en creixement actiu (flors, brotació, fruits immadurs), temperatures suaus (10-18°C) i pluges i/o humitat relativa elevada. En les inoculacions en condicions controlades tots els factors s'optimitzen per afavorir el desenvolupament de la malaltia: material vegetal en estadi susceptible (varietat sensible, fulles joves), patogen virulent i a dosis elevades ( $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>), realització de ferida i incubació a humitat relativa elevada (superior al 90%). Un altre factor que pot explicar la diferència en la temperatura òptima és el mecanisme patogènic del bacteri. En condicions naturals *P. syringae* pot aprofitar la seva capacitat nucleadora de gel i les baixes temperatures (gelades tardanes de primavera o primerenques de tardor) per provocar lesions en els òrgans i tenir vies d'infecció (Lindow, 1983).

En experiments en condicions controlades en els que es realitzin inoculacions artificials de *P. syringae* pv. *syringae* en perera i s'avaluï el desenvolupament d'infeccions i de la malaltia, és important utilitzar la temperatura d'incubació òptima, que permeti l'observació de símptomes de la malaltia de forma clara i en poc temps.

## 1.2. Efecte de l'edat de la fulla

L'estat fenològic del material vegetal afecta el desenvolupament de la malaltia causada per *P. syringae* pv. *syringae* en perera. En plantes d'hivernacle de la varietat Conference les fulles formades sobre el brot de l'any han estat sensibles que les fulles formades sobre fusta de més d'un any. En fulles joves es van obtenir nivells de severitat de la infecció del doble que en fulles velles. Aquests resultats coincideixen amb els observats en condicions naturals, on els teixits joves de perera són més sensibles a la infecció que els adults. Spotts i Cervantes (1995) van observar en arbres de perera que els brots de l'any en creixement actiu eren més susceptibles a infeccions per *P. syringae* pv. *syringae* que els que ja havien aturat el creixement. En altres hostes la sensibilitat a *P. syringae* pv. *syringae* també depèn de l'estat fenològic de l'òrgan. Les fulles joves i els fruits immadurs d'albercoquer (*Prunus armeniaca*) són més sensibles (Wimalajeewa, 1987). En la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en llorer-cirer (*Prunus laurocerasus*) les fulles de branques en creixement actiu són les més afectades, i en elles el progrés de la malaltia és més ràpid que en les adultes (Gardan i col., 1989).

En base als resultats obtinguts, si s'utilitzen tècniques d'inoculació artificial de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles de perera és important tenir en compte l'edat de la fulla. La utilització de fulles joves (fulles terminals formades en brots en creixement actiu) permet el desenvolupament d'infeccions i observar els símptomes de la malaltia en 48 hores.

## 1.3. Sensibilitat de varietats de perera a *P. syringae* pv. *syringae* i virulència del patogen

Les dues tècniques d'inoculació i tipus de material vegetal utilitzats (fulles joves separades de la planta i fruits immadurs) han permès avaluar la patogenicitat i virulència de *P. syringae* pv. *syringae* en perera i la sensibilitat de diferents varietats de perera al patogen. S'han observat diferents graus de virulència en el patogen i de sensibilitat en les varietats. Amb la tècnica d'inoculació en fruits immadurs s'han avaluat menor nombre de varietats degut a la dificultat d'obtenir fruits immadurs de totes les varietats en el mateix moment i per problemes de manipulació del material (realització d'inoculacions, incubació en cambres d'ambient controlat, etc.). Les inoculacions en fulles separades de les plantes s'han realitzat per totes les varietats i soques, en treballar amb material de tamany reduït i

de més fàcil manipulació, i haver pogut obtenir fulles de totes les varietats. Amb aquesta tècnica s'han realitzat inoculacions creuades de totes les varietats amb totes les soques.

Els símptomes desenvolupats en les inoculacions de *P. syringae* pv. *syringae* en fruits immadurs i en fulles separades de la planta són diferents dels símptomes observats en infeccions del patogen en pereres a camp. En infeccions naturals s'observen taques necròtiques en el limbe foliar sovint limitades per un estret halo vermellós. Tot i que els símptomes observats en les inoculacions són diferents dels naturals, en les inoculacions en condicions controlades s'han obtingut necrosis estenent-se per la fulla o el fruit. Això indica un progrés de la infecció des del punt d'inoculació i el desenvolupament de la malaltia. Aquests símptomes han estat diferents dels de la resposta hipersensible, en que es formen necrosis bloquejades, i dels corresponents a la inoculació d'un bacteri sapròfit (*P. fluorescens*) o d'aigua destil·lada estèril, en els que no s'han observat símptomes. Els símptomes obtinguts tant en fulles com en fruits són similars als observats per Yessad i col. (1992) en avaluar la patogenicitat de *P. syringae* pv. *syringae* en perera utilitzant les mateixes tècniques d'inoculació.

### *Virulència del patogen*

Totes les soques de *P. syringae* pv. *syringae* avaluades s'han mostrat patogèniques, amb diferent grau de virulència, en fruits immadurs i fulles joves de perera. En les inoculacions realitzades en varietats sensibles, les soques 2027.37, EPS94, EPSLL3Y i EPSMV4 han estat virulentes mentre que les soques S8 i EPS17a s'han mostrat poc virulentes, tant en fruits com en fulles. La soca 1392 s'ha mostrat més virulenta en fruits immadurs que en fulles. En les inoculacions realitzades en varietats poc sensibles no s'han observat diferències en la virulència de les soques, obtenint valors de severitat baixos en totes.

En les inoculacions en fulles, en inocular totes les soques en totes les varietats, s'ha pogut avaluar la virulència d'una determinada soca en la varietat de perera de la que ha estat aïllada. La soca EPSMV4 aïllada de la varietat General Leclerc ha estat la soca que ha produït nivells de severitat més elevats en aquesta varietat, però no ha presentat una virulència significativament superior a la de soques EPS94 i 2027.37. La soca EPSLL3Y aïllada de la varietat Conference s'ha mostrat molt virulenta en fulles d'aquesta varietat juntament amb la soca EPS94. No s'ha observat però, una especificitat clara d'una soca per la varietat d'origen, encara que sí una relació amb la seva virulència.

Les quatre soques més virulentes (EPS94, EPSMV4, EPSLL3Y i 2027.37) procedeixen de diferent òrgan de perera i de diferent zona geogràfica i en general en totes les varietats en que s'han inoculat han presentat nivells de virulència similars. Sembla ser, per tant, que no hi ha una relació entre l'òrgan d'aïllament o la zona geogràfica de procedència i la virulència d'aquestes soques.

La soca 1392, que s'ha mostrat poc virulenta en fulles, és la soca tipus de *P. syringae* pv. *syringae*, aïllada l'any 1950 de lilà (*Syringa vulgaris*) a Anglaterra (Palleroni, 1984). La baixa virulència d'aquesta soca en fulles de perera, tot i ser patogènica, pot ser deguda a que procedeix d'un hoste diferent. Gardan i col. (1990) van comparar aquesta soca amb 100 soques més de *P. syringae* pv. *syringae* aïllades de diferents hostes (entre ells perera), per 167 caràcters fenotípics mitjançant taxonomia numèrica, i van observar que aquesta soca forma un grup allunyat de la resta (distància >0.1 del grup format per les soques procedents de perera). Degut a això van considerar que no és una bona soca tipus i que caldria buscar-ne una que estigués centrada respecte els diferents grups fenotípics. La soca S8 (aïllada de perera a Anglaterra) en inoculacions en fruits de perera de la varietat Beurre Anjou s'havia mostrat patogènica i molt virulenta, i productora de bactericines (Gross i col., 1984). La baixa virulència d'aquesta soca en el nostre treball, tant en fruits com en fulles de perera, pot ser deguda a que el cultiu que hem utilitzat ha estat varis anys conservat en fred i pot haver perdut virulència durant la conservació o en les resembres. De fet, Rudolph i col. (1989) van observar que la capacitat de *P. syringae* per produir polisacàrids extracel·lulars (EPS) i altres substàncies metabòliques necessàries per a la virulència pot disminuir durant llargs períodes de cultiu en medi artificial. Una altra soca poc virulenta és l'EPS17a. Aquesta soca es va aïllar de borrons sans de perera, és epífita i la seva baixa virulència pot ser deguda a que no procedeix de teixit infectat.

El fet que la soca aïllada de lilà sigui menys virulenta en fulles de perera que la majoria de les aïllades de perera fa pensar que hi pugui haver una relació entre l'hoste de procedència i la virulència de la soca en aquest hoste. Tot i això, diferents autors parlen de manca d'especificitat de *P. syringae* pv. *syringae* per l'hoste. Gross i col. (1984) van observar que tot i que *P. syringae* pv. *syringae* no presenta especificitat per l'hoste, hi ha diferents graus de virulència en relació a l'hoste de procedència. Els diferents hostes de *P. syringae* pv. *syringae* (perera, pomera, cirerer, presseguer i albercoquer) poden servir de font d'inòcul de soques patogèniques a altres plantacions veïnes (Gross i col., 1984). Per altra banda, Montesinos i col. (1987) van observar que algunes soques de *P. syringae* pv.

*syringae* aïllades de pomera, cirerer, albercoquer i presseguer no eren patògenes en perera.

Seria interessant avaluar la patogenicitat i virulència d'un major nombre de soques de *P. syringae* pv. *syringae* procedents de teixits infectats i de teixits sans, i de diferents hostes a fi de determinar la relació entre la patogenicitat i virulència d'una soca en perera amb la seva procedència, i conèixer hostes que podrien servir de reservori d'inòcul fora de les plantacions de perera.

### *Sensibilitat varietal*

Cap de les varietats avaluades s'ha mostrat resistent a *P. syringae* pv. *syringae*, amb les tècniques d'inoculació utilitzades. Tot i això algunes varietats com els perers autòctons MB-6, MB-7 i MB-14 s'han mostrat poc sensibles.

En les inoculacions amb soques virulentes els valors de severitat han estat més elevats, en la majoria de varietats, que en les inoculacions amb soques poc virulentes. Amb les soques virulentes, en obtenir un rang més ampli de nivells de severitat, s'ha observat una gradació en la sensibilitat de les varietats estudiades. Això ha permès agrupar les varietats en molt sensibles, mitjanament sensibles i poc sensibles al patogen. En fruits immadurs els nivells de severitat obtinguts amb la soca virulenta (*P. syringae* pv. *syringae* 2027.37) han estat elevats per totes les varietats ( $I_s > 0.25$ ), no observant-se varietats poc sensibles. En fulles en canvi, algunes varietats han presentat nivells de severitat inferiors ( $I_s < 0.25$ ) en ser inoculades amb algunes de les soques virulentes i per tant s'han mostrat poc sensibles. En general, la majoria de varietats han mostrat la mateixa sensibilitat en fruits i fulles. La varietat General Leclerc però, en fruits ha estat la varietat més sensible i en fulles ha estat moderadament sensible.

La majoria de varietats de perera d'interès comercial a Europa i Amèrica del Nord s'han mostrat sensibles al patogen. Les varietats Williams, Kaiser i D. Comice, importants a nivell mundial i les més importants a Amèrica del Nord, són mitjanament sensibles. Entre les varietats de perera importants pel que fa a producció i comercialització a Europa en trobem de molt sensibles com Conference, B. Hardy, Super Comice i Guyot Precoç i de mitjanament sensibles com General Leclerc, Abate Fétel, Passe Crassane, Williams, Blanquilla, Comice, Alexandrine, B. Anjou, Morettini i Ercolini. D'aquestes, la varietat Blanquilla gairebé només es cultiva a l'estat espanyol i és la varietat de perera més

important a Lleida (Catalunya). Entre les varietats molt i mitjanament sensibles hi ha varietats precoces (Morettini i J. Guyot), d'estiu (Williams), de tardor (Conference, Abate Fétel, General Leclerc, D. Comice) i d'hivern (Passe Crassane). A Girona, les varietats més cultivades són de tardor i d'hivern, principalment Conference i Passe Crassane. La majoria de les varietats que s'han mostrat sensibles a *P. syringae* pv. *syringae* també ho són a *E. amylovora* (López i col., 1996; Le Lézec i col., 1997), i al fong *Stemphylium vesicarium* que causa una de les principals malalties de la perera en els països productors de la zona mediterrània, en concret a les comarques de Girona provoca danys importants (Montesinos i col., 1995), (Taula 1.33).

Entre les varietats autòctones avaluades, algunes com MB-19, MB-20, MB-21 i MB-25 s'han mostrat sensibles. Entre les poc sensibles hi ha les varietats Maxine, Rogue Red, Winter Nellis i els perers autòctons MB-6, MB-7 i MB-14. La varietat Maxine també ha presentat baixa sensibilitat a *E. amylovora*, en canvi, la varietat Rogue Red és moderadament sensible al foc bacterià (López i col., 1996; Le Lézec i col., 1997). La varietat Winter Nellis, sovint utilitzada com a portaempelt, tot i haver-se mostrat poc sensible a *P. syringae* pv. *syringae* és molt sensible a *E. amylovora* (Jones i Aldwinckle, 1990).

En quant a la sensibilitat de diferents varietats de perera a la necrosi de borrons de flor, en plantacions comercials de les comarques de Girona les varietats que són més sensibles i han estat molt afectades per la malaltia són Passe Crassane, Conference, D. Comice i Grand Champion (Montesinos i col., 1987), varietats que en aquest treball s'han mostrat sensibles a *P. syringae* pv. *syringae*. En aïllaments realitzats en diferents finques comercials de les comarques de Girona i Lleida es va observar que hi havia varietats com Conference, General Leclerc, Passe Crassane, i D. Comice amb elevats nivells poblacionals de *P. syringae* pv. *syringae*, mentre que altres varietats com B. Hardy, Bonne Louise i Grand Champion tenien nivells més baixos, i això estava relacionat amb els danys per gelada (Montesinos i Vilardell, 1989).

El portaempelt OHF333 (híbrid franc: Old Home x Farmingdale) s'ha mostrat mitjanament sensible en les inoculacions en fulles. Aquest portaempelt s'havia mostrat poc sensible a *E. amylovora* en inoculacions artificials en condicions naturals (Le Lézec i col., 1997). Seria interessant estudiar la sensibilitat d'altres portaempelts de perera a *P. syringae* pv. *syringae*, com el BA29 (codonyer), sobre el que estaven empeltades les varietats que hem avaluat, i el seu efecte en la sensibilitat de les diferents varietats de perera. El portaempelt és un factor que pot afectar la sensibilitat de les varietats al patogen.



**Taula 1.33.** Sensibilitat de les principals varietats europees de perera a *P. syringae* pv. *syringae*, *E. amylovora* i *Stemphylium vesicarium*

Varietat	Sensibilitat al patogen		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> <sup>a</sup>	<i>E. amylovora</i> (Foc bacterià) <sup>b</sup>	<i>S. vesicarium</i> <sup>c</sup>
Abate Fétel	Elevada	Elevada	Elevada
Alexandrine	Mitjana	Elevada	Elevada
B. Anjou	Mitjana	Mitjana	Mitjana
B. Hardy	Elevada	Mitjana	Baixa
Blanquilla	Mitjana	Elevada	Baixa
Bonne Louise	Mitjana-Elevada	Mitjana	Baixa
Conference	Elevada	Mitjana	Elevada
D. Comice	Mitjana	Elevada	Elevada
El Dorado	Mitjana-Baixa	Mitjana	Mitjana
General Leclerc	Mitjana	Elevada	Mitjana
Grand Champion	Mitjana	Elevada	Baixa
Highland	Mitjana	Elevada	Baixa
Jules Guyot	Mitjana	Elevada	Baixa
Kaiser	Mitjana	Mitjana	Mitjana
Magness	Mitjana	Baixa	Baixa
Maxine	Mitjana	Baixa	Mitjana
Morettini	Mitjana	Mitjana	Baixa
Packam's Triumph	Mitjana	Elevada	Elevada
Passe Crassane	Mitjana	Elevada	Elevada
Pierre Corneille	Mitjana	Mitjana	Mitjana
Président Heron	Mitjana	Elevada	Baixa
Rogue Red	Baixa	Mitjana	-
Williams	Mitjana	Elevada	Baixa
Winter Nellis	Mitjana	Elevada	Mitjana
<i>Patrons</i>			
OHF	Mitjana	Baixa	-

<sup>a</sup> Inoculacions en condicions controlades de fulles joves de les diferents varietats amb soques virulentes de *P. syringae* pv. *syringae* (resultats presentats en aquest treball)

<sup>b</sup> A partir de fonts diverses (López i col., 1996; Le Lézec i col., 1997)

<sup>c</sup> Resultats d'inoculacions en condicions controlades de soques virulentes de *S. vesicarium* en fruits immadurs de les diferents varietats (Moragrega, 1994; Montesinos i col., 1995)

S'ha vist que els albercoquers (*Prunus armeniaca*) empeltats sobre presseguer (*Prunus persica*) són menys sensibles a *P. syringae* pv. *morsprunorum* que els empeltats sobre prunera (*Prunus domestica*), i els empeltats sobre albercoquer són mitjanament sensibles. Pel que fa a les pruneres, les empeltades sobre presseguer són més resistents que les empeltades sobre prunera (Cameron, 1962).

La sensibilitat de les diferents varietats de perera determinada en aquest treball correspon a la sensibilitat genètica. Per a que la sensibilitat d'una varietat a un patògen s'expressi a nivell de camp (sensibilitat agronòmica) cal que l'hoste estigui en estat susceptible, el patògen sigui virulent i les condicions ambientals siguin favorables. Hi ha molts factors que poden fer variar la sensibilitat agronòmica d'una varietat. Degut a la diferència en el temps d'infecció i les condicions climàtiques, les varietats que en unes zones geogràfiques són resistents, en altres poden ser sensibles. En perera, a Amèrica del Nord (Oregon) *P. syringae* pv. *syringae* causa danys severos a les varietats Williams i Winter Nellis (Cameron, 1962). En canvi, en les inoculacions realitzades sobre fulles amb aïllats procedents de diferents hostes i zones geogràfiques la varietat Winter Nellis cultivada en una finca de Girona s'ha mostrat poc sensible.

El poc interès comercial de les varietats que s'han mostrat poc sensibles fa pensar que aquestes varietats podrien ser utilitzades en programes de millora genètica, però no com a varietats productives en finques comercials. Seria interessant avaluar la sensibilitat al patògen de noves varietats que sembla que poden tenir interès comercial, com Cascade, Etrusca, Giolú, algunes de les noves varietats resistents al foc bacterià com Bautomne, Harrow Sweet i Harvest Queen (Sansavini i col., 1997), i altres com la varietat Bauroutard que al ser una nova varietat d'hivern podria substituir la varietat Passe Crassane. La varietat Bauroutard però, és molt sensible a *E. amylovora* (Le Lézec i col., 1997). Algunes de les noves varietats si fossin poc sensibles a *P. syringae* pv. *syringae* podrien substituir-ne de sensibles en zones on la malaltia fos un problema.

Els principals objectius de la millora genètica en perera estan orientats a trobar noves varietats amb característiques agronòmiques i pomològiques que compleixin les exigències de producció, conservació, transformació industrial i comercialització, i a la vegada que siguin varietats rústiques i resistents a malalties. A Canadà, Estats Units i França, principalment, hi ha prioritat per obtenir varietats resistents al foc bacterià (*E. amylovora*), en canvi en països on aquesta malaltia no és un problema greu (Itàlia, Espanya) es busquen varietats resistents a gelades i fred hivernal o a fortes calors d'estiu. Fins al moment les darreres varietats obtingudes que són resistents al foc bacterià

presenten característiques pomològiques inferiors a les cultivades actualment (Bellini, 1993). Aquestes noves varietats serien interessants en zones on la malaltia és un problema i perquè poden servir de base per a la millora de les varietats de perera.

Pel que fa a les tècniques i material vegetal utilitzats per avaluar la sensibilitat varietal i patogenicitat i virulència del patogen, totes dues tècniques emprades en aquest treball han estat efectives, obtenint resultats similars en les inoculacions en fruits immadurs i en fulles joves. Tot i això, la tècnica d'inoculació en fulles permet processar major nombre de mostres, més ràpidament i inocular una concentració d'inòcul coneguda i igual en totes les fulles. A més, presenta l'avantatge que el material vegetal és disponible durant un període més llarg de temps, ocupa menys espai i el desenvolupament dels símptomes és més ràpid (48 hores). Cal tenir en compte, en utilitzar aquestes tècniques per estudiar diferents aspectes de la patogènia del bacteri en perera, que el desenvolupament de la malaltia i la severitat de les infeccions de *P. syringae* pv. *syringae* depenen de la virulència del patogen i de la sensibilitat de la varietat. La utilització de soques virulentes i varietats sensibles afavoreixen el desenvolupament de la malaltia i augmenten la sensibilitat del mètode.

## **2. Desenvolupament d'una tècnica d'inoculació de *P. syringae* pv. *syringae* en planta sencera de perera**

El desenvolupament de símptomes macroscòpics de la malaltia en fulles de perera infiltrades amb una soca virulenta de *P. syringae* pv. *syringae* depèn de la dosi d'inòcul. El nombre crític de bacteris per desenvolupar la malaltia i observar símptomes de la infecció ha estat de  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>. A partir d'aquesta dosi, en augmentar el nombre de bacteris infiltrats augmenta la severitat de la malaltia. La dosi infectiva mitjana per *P. syringae* pv. *syringae* en perera determinada en aquest treball és de  $5 \times 10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>. Aquesta dosi coincideix amb l'obtinguda per la majoria de bacteris fitopatògens necrogènics, ja que tot i que la dosi crítica de bacteris és característica de cada combinació bacteri-hoste, aquesta sol ser d'entre  $10^4$  i  $10^6$  cèl·lules ml<sup>-1</sup> (Goodman i Novacky, 1994). Daub i Hagerdorn (1980) van observar que pel desenvolupament de símptomes de la malaltia en inocular *P. syringae* pv. *syringae* en fulles de mongetera eren necessàries més de  $10^4$  cèl·lules cm<sup>-2</sup> de fulla. En condicions naturals la dosi infectiva mitjana (DE<sub>50</sub>) pel desenvolupament de la malaltia en mongetera és de  $3 \times 10^5$  ufc fulla<sup>-1</sup> (Rouse i col., 1985).

Els símptomes desenvolupats en les fulles de perera inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* amb dosis superiors a  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup> han estat necrosis toves, turgents, inicialment en el punt d'inoculació i progressivament estenent-se per la fulla en major o menor grau en funció de la dosi d'inòcul. Aquesta simptomatologia es correspon amb els símptomes descrits en el desenvolupament de la malaltia en fulles de diferents espècies vegetals per bacteris fitopatògens necrogènics (Rudolph i col., 1989).

El temps necessari per a l'aparició dels símptomes de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles de perera també s'ha mostrat dependent de la dosi d'inòcul. En les inoculacions realitzades amb  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> els primers símptomes apareixen a les 48 hores de les inoculacions i als 3 dies s'observen símptomes clars. A la dosi de  $10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> no apareixen símptomes fins als 3 dies de les inoculacions, observant-se de forma clara als 4-5 dies, i en les inoculacions amb  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup> els símptomes apareixen als 5 dies de la inoculació. Burkowicz i Goodman (1969) també van observar un efecte de la dosi d'*E. amylovora* en l'aparició de símptomes en fulles de pomera. L'aparició de símptomes era més ràpida quant més elevada era la dosi de patogen infiltrada, passant de 12-24 hores per dosis de  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> a 42 hores per a la dosi de  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>. A la dosi de  $10^5$  ufc ml<sup>-1</sup> no es va observar aparició de símptomes. El diferent període de temps d'aparició de símptomes a cada una de les dosis d'inòcul pot estar relacionat amb el temps necessari per a la multiplicació bacteriana i l'assoliment de nivells poblacionals que permetin la formació de necrosis confluents i visibles.

En inoculacions realitzades amb *P. syringae* pv. *syringae* a la dosi de  $10^9$  ufc ml<sup>-1</sup> (resultats no presentats en aquest treball) s'observen necrosis seques, bloquejades i sovint limitades per un halo cloròtic, simptomatologia típica de la resposta hipersensible, no de la malaltia. Aquesta simptomatologia és similar a l'observada per Klement (1982) en inocular elevades dosis de *P. syringae* pv. *tabaci* en tabac (situació compatible). En general la dosi de patogen per desenvolupar la resposta hipersensible en la situació compatible sol ser 100 vegades superior a la necessària pel desenvolupament de la resposta hipersensible en la situació incompatible (Goodman i Novacky, 1994).

La tècnica d'inoculació de *P. syringae* pv. *syringae* per microinfiltració en plantes de perera i les condicions d'incubació utilitzades en aquest treball permeten el desenvolupament de la malaltia i l'observació de símptomes clars als 3-5 dies de les inoculacions. L'avaluació de l'efecte de la dosi d'inòcul en la severitat de les infeccions ha permès establir la dosi òptima per observar símptomes clars de la malaltia, que no puguin interferir amb la resposta hipersensible, en un període curt de temps. Aquesta dosi estaria

entre  $10^7$  i  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>. Dosis inferiors podrien desenvolupar símptomes febles de la malaltia i dosis superiors els de la resposta hipersensible.

Aquesta tècnica permet inocular dosis conegudes de patogen i observar la resposta de la planta sencera a la interacció. Té varis avantatges com poder utilitzar material vegetal homogeni, de dimensions reduïdes (plantes obtingudes per micropropagació mantingudes en hivernacle) i la possibilitat de realitzar diverses inoculacions en una fulla (4 o 6 inoculacions, segons el tamany de la fulla) i així treballar amb moltes repeticions en una mateixa planta, ja que els símptomes de cada infiltració es mantenen separats i són independents. En ser una tècnica d'inoculació similar a les utilitzades per altres autors (Klement, 1963) per inocular bacteris fitopatògens en teixits vegetals permet obtenir simptomatologies i respostes de la planta comparables.

En inocular totes les fulles de la planta és important conèixer l'efecte de l'edat de la fulla o la posició de la fulla en la planta en el desenvolupament de la malaltia. Si s'utilitzen plantes homogènies, amb brots en creixement actiu formats de 15 dies a 1 mes abans de les inoculacions, no s'observa efecte de l'edat de la fulla en la severitat de les infeccions per inoculacions realitzades a les dosis de  $10^6$  i  $10^7$  ufc ml<sup>-1</sup>. A la dosi de  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> s'obtenen nivells de severitat més elevats en les fulles joves que en les fulles velles. L'efecte de l'edat de la fulla en la severitat de la malaltia depèn, per tant, de la dosi d'inòcul. El mateix efecte de l'edat de la fulla es va observar en les inoculacions de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en fulles de perera separades de la planta inoculant el patogen a la dosi  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>. En diferents interaccions bacteri-planta s'ha observat l'efecte de l'edat de la fulla en el desenvolupament de la malaltia i de la resposta hipersensible, afectant la taxa de sortida d'electròlits i els canvis en la permeabilitat de la cèl·lula vegetal. Burkowicz i Goodman (1969) van observar que en infiltrar suspensions d'*E. amylovora* a la dosi màxima ( $10^9$  ufc ml<sup>-1</sup>) obtenien nivells de severitat superiors en les fulles joves que en les velles.

És important, per tant, si s'utilitza la tècnica d'inoculació del patogen en la planta sencera, tenir en compte les característiques del material vegetal amb que es treballa i la dosi d'inòcul. Per evitar un efecte de l'edat de la fulla en el desenvolupament de la malaltia és aconsellable treballar amb dosis de patogen inferiors a  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> i utilitzar plantes amb brots joves, d'1 a 2 mesos màxim, en els que no hi hagi una diferència d'edat molt gran entre les fulles del brot tendre i les del brot més d'un any. Tot i això caldrà observar la malaltia en els dos tipus de fulles abans de considerar la planta sencera.

### 3. Multiplicació bacteriana i desenvolupament de símptomes en la interacció *P. syringae*-perera

El creixement poblacional de *P. syringae* en l'espai intercel·lular de fulles de perera ha estat diferent en funció del tipus d'interacció. En la situació compatible es produeix una multiplicació dels bacteris, amb un augment en 48 hores de 10 vegades la població inicial. En la situació incompatible la població disminueix, arribant en 48 hores a nivells poblacionals 100 vegades inferiors als inicials.

El nivell poblacional final de bacteris depèn de la quantitat inicial inoculada i del tipus d'interacció. En la situació compatible (*P. syringae* pv. *syringae* EPS94) en les inoculacions amb  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> s'han obtingut nivells poblacionals a les 48 hores d'incubació superiors que en les inoculacions amb  $10^7$  ufc ml<sup>-1</sup>. Per cap de les dosis inoculades s'ha observat creixement exponencial durant el període d'incubació, possiblement degut a que el període d'incubació ha estat massa curt i que caldrien de 3 a 5 dies per observar aquest tipus de creixement. De fet, seria interessant conèixer si al final d'un període de temps més llarg (3-5 dies) els nivells poblacionals es mantenen diferents en funció de la dosi inoculada o s'igualen. En general la població bacteriana en un hoste sensible augmenta en varis ordres de magnitud al cap d'1 a 5 dies d'incubació (Goodman i Novacky, 1994). En la situació incompatible (*P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68) l'evolució de la població bacteriana també s'ha vist afectada per la dosi inoculada. El nombre de bacteris al final de la incubació ha estat 10 vegades inferior en les inoculacions a la dosi de  $10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> que a la dosi de  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>.

L'efecte del tipus d'interacció i la dosi inicial d'inòcul s'ha observat també en el desenvolupament de símptomes macroscòpics. Els símptomes desenvolupats en fulles de perera per la infiltració dels bacteris fitopatògens han estat diferents en cada situació compatible i incompatible.

En la situació compatible s'han observat lesions amb necrosis toves, turgents, progressives per la fulla a partir del punt d'inoculació. La intensitat o severitat de les lesions és diferent segons la concentració de bacteris infiltrats. Les lesions observades són les característiques del desenvolupament de la malaltia per bacteris fitopatògens necrogènics en un hoste susceptible (Rudolph i col., 1989). Els símptomes de la infecció comencen a aparèixer a les 48 hores de les inoculacions a les dosis de patogen més elevades i als 3 dies a la dosi inferior. En els dos casos els símptomes de desenvolupament d'infeccions s'observen de forma clara als 5 dies de les inoculacions,

amb major severitat a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>. El desenvolupament de necrosis turgents per la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles de perera indica l'acumulació d'aigua en l'espai intercel·lular, probablement per la producció de polisacàrids extracel·lulars per part del bacteri (Rudolph i col., 1989). Això afavoreix la multiplicació bacteriana, ja que aquesta està correlacionada amb el contingut hídric de l'espai intercel·lular (Goodman i Novacky, 1994).

En la situació incompatible apareixen necrosis seques, limitades a una petita zona al voltant del punt d'inoculació, que no progressen, quedant bloquejades. Aquests símptomes només s'han observat de forma clara a la dosi d'inòcul més elevada ( $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>) als 5-7 dies de les inoculacions. A la dosi inferior ( $10^7$  ufc ml<sup>-1</sup>) no s'han desenvolupat símptomes clars. Els símptomes observats en la situació incompatible es corresponen amb els descrits pel desenvolupament de la resposta hipersensible en diferents hostes: augment de la flacciditat dels teixits, pèrdua de la turgència i col·lapse del teixit que acaba dessecant-se fins assecar-se, en alguns casos en 48h. Com a conseqüència la població bacteriana disminueix i els bacteris que sobreviuen queden confinats al punt d'inoculació (Goodman i Novacky, 1994).

Pel tipus d'inoculacions realitzades i les condicions d'incubació utilitzades, en perera els símptomes de la interacció compatible amb *P. syringae* pv. *syringae* es desenvolupen més ràpidament que els de la resposta hipersensible (*P. syringae* pv. *phaseolicola*). En les dues situacions es produeix una interacció activa bacteri-planta, amb una resposta de la planta des de l'inici de les inoculacions, abans del desenvolupament de símptomes. Aquesta interacció permet, en el cas de la situació compatible la multiplicació bacteriana i en la incompatible provoca la seva disminució. Per iniciar el desenvolupament tant de la resposta hipersensible com de la malaltia són necessaris bacteris vius (Klement i Goodman, 1967b). En el cas de la resposta hipersensible hi ha un reconeixement del patògen per part de la planta que li permet desenvolupar un mecanisme per bloquejar la multiplicació bacteriana i provocar la ràpida mort cel·lular i col·lapse dels teixits vegetals (Figura 2).

La tècnica d'inoculació utilitzada (microinfiltració localitzada en les fulles), tot i ser una tècnica d'inoculació artificial del patògen amb realització de ferida, permet diferenciar de forma clara la simptomatologia del desenvolupament de malaltia o de la resposta hipersensible en inocular *P. syringae* en perera. Per les condicions d'incubació utilitzades (25 °C, 16h llum i 18 °C, 8 h fosc i humitat relativa del 70-80%) els símptomes de la malaltia s'observen de forma clara als 5 dies de les inoculacions i els de la resposta

hipersensible als 5-7 dies. Aquesta tècnica podrà ser utilitzada per a l'avaluació de l'efecte de fosfonats en la interacció *P. syringae* pv. *syringae* -perera, sempre que s'utilitzin les dosis de patogen i condicions d'incubació òptimes per a la diferenciació de cada resposta. És important fixar les condicions d'incubació ja que el desenvolupament dels símptomes depèn de factors com la temperatura, els nutrients i la humitat. Goodman (1972) va mostrar que la formació de necrosis seques típiques de la resposta hipersensible es pot suprimir mantenint el teixit vegetal amb humitat relativa elevada (superior al 90%), formant-se en aquest cas necrosis turgents, característiques de la malaltia. S'ha observat també que el desenvolupament de la resposta hipersensible està controlat per gens sensibles a la temperatura, en general la resposta hipersensible és induïda per temperatures d'entre 18 i 22 °C, no desenvolupant-se a temperatures superiors a 28-30 °C (Goodman i Novacky, 1994). En el cas concret de *P. syringae* pv. *phaseolicola* en tabac (interacció incompatible) no es desenvolupen símptomes de la resposta hipersensible a temperatures superiors a 26 °C, en canvi a temperatures inferiors a 26 °C sí que s'observen (Klement i Rudolph, 1994).

#### **4. Canvis estructurals en els teixits de perera durant la interacció amb *P. syringae***

A les 48 hores de la inoculació de *P. syringae* a la dosi de  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> s'observen canvis en l'estructura dels teixits de fulla de perera, tant en la situació compatible com en la incompatible. Els símptomes microscòpics s'han observat abans que els macroscòpics.

La modificació de l'estructura dels teixits de la fulla en la zona infiltrada amb els bacteris ha estat diferent en cada una de les situacions. Al microscopi òptic s'observa que els canvis més importants s'han produït en les cèl·lules del mesofil·le de la fulla. El mesofil·le manté la seva integritat en la situació compatible, tot i observar-se un cert grau de desestructuració en el parènquima esponjós, però no en la incompatible. En la situació incompatible es produeix una desorganització del teixit parenquimàtic i dels feixos vasculars de la fulla. En aquest cas el mesofil·le de la fulla és ocupat per espais limitats possiblement per agregats cel·lulars, ja que no s'observen cèl·lules ben definides. La pèrdua de l'estructura de les cèl·lules parenquimàtiques pot ser deguda a alteracions de la membrana plasmàtica, que provocarien la sortida del contingut cel·lular i la mort cel·lular i col·lapse dels teixits.



En observar al microscopi electrònic de rastreig la zona infiltrada amb *P. syringae* pv. *phaseolicola* en les fulles de perera (situació incompatible) es posa de manifest la formació d'agregats o material fibril·lar en l'espai intercel·lular. Aquests agregats no s'observen fora de la zona infiltrada amb els bacteris ni en la situació compatible. Aquest material podria estar relacionat o correspondre a les vesícules i material granular observats per altres autors en la interfase planta-patogen en el desenvolupament de la resposta hipersensible, com l'observat en tabac per Goodman (1972).

Les microelectrografies de transmissió han permès localitzar els bacteris en els teixits de fulla, a les 48 hores de la inoculació, en les dues situacions compatible i incompatible. Aquestes observacions han posat de manifest la interacció bacteri-planta i els canvis en l'estructura de les cèl·lules vegetals i en l'organització dels teixits durant la interacció. Tant en la situació compatible com en la incompatible els bacteris s'han localitzat en l'espai intercel·lular del parènquima, propers a la paret cel·lular vegetal. La interacció bacteri-planta ha estat diferent en cada situació.

En la situació compatible s'han observat cèl·lules bacterianes properes a la paret cel·lular vegetal, en alguns casos mantenint contacte físic directe amb la cèl·lula vegetal a través de les respectives parets cel·lulars, i en altres establint contacte mitjançant estructures granulars electrodenses. Aquestes estructures només s'han observat en la situació compatible i limitades a la zona infiltrada amb els bacteris. Això fa pensar en la intervenció d'aquestes estructures en la comunicació bacteri-planta, enviant senyals per a permetre el desenvolupament de la malaltia i/o anul·lar la resposta de defensa de la planta. Aquestes observacions coincideixen amb el fet que la comunicació bacteri-planta es dona en l'espai intercel·lular a través de la paret cel·lular vegetal, en ser necessari un flux de nutrients cap a l'espai intercel·lular que permeti la multiplicació bacteriana i el desenvolupament de la malaltia. Aquest flux es produeix com a resposta a senyals entre el bacteri i la cèl·lula vegetal (Goodman i Novacky, 1994). Segons aquests autors, l'adhesió del bacteri a punts específics de la superfície de les cèl·lules vegetals és essencial pel desenvolupament de la infecció. El reconeixement de productes del patogen com polisacàrids i glucoproteïnes de la superfície cel·lular bacteriana per molècules receptores de la paret cel·lular de la planta s'ha suggerit com el primer pas que porta al desenvolupament de la malaltia o de la resposta hipersensible (Ouchi, 1983). En tots els casos, el reconeixement hoste-patogen es produeix mitjançant el contacte entre compostos 'senyal' del patogen i 'receptors' de l'hoste. Encara no es coneixen però, quines molècules de la superfície de la cèl·lula hoste i del bacteri estan implicades en el procés de reconeixement. Tot i que s'han caracteritzat alguns inductors de la resposta hipersensible

(harpines) en *P. syringae* pv. *syringae*, els receptors de la cèl·lula hoste no es coneixen. Pel que fa a la supressió del desenvolupament de la resposta de defensa en la planta, els bacteris fitopatògens sintetitzen compostos que poden actuar interferint en la resposta de resistència en la planta com a supressors. Aquests compostos solen ser polisacàrids o glucoproteïnes (Ouchi, 1983). Com s'ha comentat en la introducció general, diverses molècules poden intervenir en el desenvolupament de la patogènia de *P. syringae* pv. *syringae*, com toxines, enzims extracel·lulars, i polisacàrids extracel·lulars. Els polisacàrids extracel·lulars (EPS) de *P. syringae* pv. *syringae* permeten al bacteri absorbir aigua i sobreviure i colonitzar els teixits, a la vegada que interactuen amb polisacàrids de la paret cel·lular vegetal (Rudolph i col., 1989). Aquests autors van observar, en bacteris formadors de necrosis foliars, que durant la patogènia les cèl·lules de la planta es degraden lentament i l'espai intercel·lular és omplert per masses bacterianes envoltades de mucositat. Aquesta mucositat sembla estar composta per EPS bacterià que tindria un paper decisiu en el manteniment de la interacció compatible. Per altra banda, Boher i col. (1995) en talls ultrafins de fulles de mandioca (*Manihot esculenta*) infectades per *X. campestris* pv. *manihotis* incubats amb anticossos anti-EPS marcats amb or, van observar l'adhesió de partícules d'or en el material del voltant dels bacteris i en les estructures granulars bacterianes. Les estructures granulars en la superfície de les cèl·lules bacterianes han estat observades per diversos autors, en concret *P. phaseolicola* en fulles de plantes susceptibles sovint presenta vesícules que sobresurten de la superfície bacteriana (Sigeo i Epton, 1975; El-Banoby i col., 1981). Aquestes vesícules s'han relacionat amb la producció de mucositat bacteriana (Rudolph i col., 1989).

En la situació incompatible (*P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68) s'ha observat la presència de cèl·lules bacterianes en l'espai intercel·lular dels teixits parenquimàtics de la fulla en el punt d'inoculació. Els bacteris es trobaven limitats per les parets de cèl·lules vegetals veïnes, sovint en nombre elevat i formant agregats. En la majoria de bacteris situats propers a la paret de les cèl·lules vegetals s'ha observat una matriu fibril·lar envoltant o recobrint les cèl·lules bacterianes. Aquesta matriu fibril·lar no s'ha observat en la situació compatible. La localització dels bacteris formant agregats en la zona d'inoculació i la presència de la matriu fibril·lar implicarien una resposta de la planta per limitar i bloquejar el bacteri. Les cèl·lules bacterianes en la situació incompatible en general s'han mostrat menys electrodenses que en la compatible, aquest fet es podria atribuir a una menor activitat metabòlica del bacteri en la situació incompatible, en comparació amb la compatible en que s'han observat fins i tot cèl·lules bacterianes en divisió. L'aglutinació de les cèl·lules bacterianes en la resposta hipersensible s'ha observat en diferents interaccions bacteri-planta (Ouchi, 1983). En algunes d'elles les

lectines de la paret de cèl·lules vegetals (proteïnes o glucoproteïnes de la superfície cel·lular que intervenen en el reconeixement d'estructures específiques de sucres) reconeixen determinats sucres dels polisacàrids extracel·lulars (EPS), o lipopolisacàrids (LPS) bacterians i aglutinen els bacteris, jugant un paper important en la inicialització de la reacció hipersensible. La matriu fibril·lar que engloba o atrapa les cèl·lules bacterianes properes a la superfície externa de la paret cel·lular vegetal s'ha observat també en diferents interaccions incompatibles bacteri-planta (Al-Mousawi i col., 1983; Sequeira, 1985; Rudolph i col., 1989; Brown i col., 1993). L'origen i composició d'aquest material no estan clars. Brown i col. (1993) van estudiar l'origen de la matriu fibril·lar formada al voltant de les cèl·lules de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* durant la interacció amb pebroter, i van observar que corresponia a EPS bacterià, no a components de la paret cel·lular de la planta. Sequeira (1985), en canvi, en la interacció de *P. syringae* pv. *glycinea* amb cèl·lules de soja resistents va posar de manifest que hi intervenen lectines de la planta (glucoproteïnes riques en hidroxiprolina) i carbohidrats bacterians. La reacció incompatible en moltes interaccions hoste-patogen va lligada al desenvolupament ràpid de la resposta de defensa múltiple en la planta (reacció hipersensible, fitoalexines i formació de barreres defensives). Aquests esdeveniments són activats pel reconeixement de determinants de l'avirulència en el patogen (inductors) per part de receptors en la planta (Dixon i col., 1994).

En quant als canvis estructurals en els teixits de la fulla de perera durant la interacció amb *P. syringae* s'ha observat que només les cèl·lules vegetals amb bacteris propers a la seva superfície han sofert modificacions. Tant el desenvolupament de la malaltia com el de la resposta hipersensible han provocat modificacions en l'organització de les cèl·lules vegetals. Aquests canvis s'han observat de forma clara a les 48 hores de les inoculacions. Tot i que els canvis estructurals han estat similars en les dues situacions (pèrdua de la integritat de les membranes dels orgànuls, desaparició de l'estroma dels cloroplasts i desorganització dels grana, citoplasma més electrodens i desaparició dels vacuols), en la situació compatible la pèrdua de l'organització cel·lular ha permès el creixement i multiplicació bacteriana i el progrés de la infecció, mentre que en la incompatible ha provocat el bloqueig del bacteri. En la situació compatible les cèl·lules vegetals més afectades han estat les del punt d'inoculació, on el desenvolupament de la infecció per part del patogen ha provocat la desorganització i fins i tot la mort cel·lular (corresponent al punt d'inici de les necrosis). En les cèl·lules parenquimàtiques properes al punt d'inoculació s'ha observat la presència de bacteris però no s'han produït canvis importants en l'organització cel·lular, tot i que en algunes cèl·lules s'ha observat un inici de desorganització dels cloroplasts. Això indicaria la colonització dels teixits vegetals per

part del bacteri i el desenvolupament i progrés de la infecció per la fulla. En la situació incompatible, en canvi, no s'han observat bacteris fora del punt d'inoculació, la qual cosa indica el bloqueig del bacteri per part de la planta. Els canvis observats en les dues situacions han afectat principalment la permeabilitat de les membranes cel·lulars i dels orgànuls. Com a resultat de l'alteració de la membrana plasmàtica es produeix la descompartimentació i molts enzims i els seus substrats (normalment separats) interactuen (Goodman i Novacky, 1994). Probablement degut a això el citoplasma de les cèl·lules properes a *P. syringae* s'ha observat més electrodens. Aquests resultats coincideixen amb els canvis ultraestructurals en els teixits de diferents espècies vegetals durant la interacció amb bacteris fitopatògens observats per diferents autors tant en la situació compatible (Boher i col., 1995; Abo-Foul i col., 1996), com en la incompatible (Goodman, 1972; Goodman i col., 1976). Abo-Foul i col. (1996) van observar, en fulles de plantes de cogombre, que tant en la reacció hipersensible com en la infecció de per *Ampelomyces quisqualis* es produïen canvis en els cloroplasts de les cèl·lules vegetals que estaven en contacte amb el patogen, en concret els grana dels cloroplasts tenien els apilaments menys definits, la membrana dels cloroplasts es trencava en alguns punts i augmentava la presència de gotes osmiofíliques. En general les modificacions en l'estructura cel·lular han estat similars en les dues situacions, la diferència està, com indiquen Goodman i Novacky (1994) en la velocitat i intensitat en que es donen en cada cas.

Només en la situació incompatible, però, s'ha observat la formació d'agregats citoplasmàtics i de papil·les (estructures paramurals situades en la cara interna de la paret cel·lular, entre la paret i la membrana plasmàtica) i vesícules de membrana en la zona amb contacte amb els bacteris. Aquests canvis estructurals es corresponen amb els observats per Goodman i col. (1976) en la interacció incompatible *P. syringae* pv. *pisi* -tabac i són característics de la inducció de la resposta hipersensible. La formació d'apocisicions en la paret cel·lular i de vesícules lligades a la membrana indiquen una resposta activa de les cèl·lules de l'hoste a les senyals del bacteri (Goodman i Novacky, 1994). Sembla ser que les papil·les es formen per la translocació d'ions i substàncies inorgàniques de l'hoste a l'espai intercel·lular, i solen anar lligades a àrees d'elevada activitat metabòlica i de síntesi, amb presència d'elevat nombre de mitocondris, reticle endoplasmàtic rugós, vesícules de Golgi i polirribosomes. El moviment de les vesícules cap a la cara interna de la paret cel·lular es realitza a través de filaments d'actina i microtúbuls i sembla que està regulat pel  $Ca^{2+}$ , en concret va lligat a un augment de  $Ca^{2+}$  en el citosol (Kunoh, 1990). Una altra modificació de la cèl·lula vegetal observada només en la situació incompatible ha estat la plasmòlisi cel·lular, amb separació de la membrana plasmàtica de la paret cel·lular i per tant pèrdua de turgència de la cèl·lula. Coincidint amb els nostres resultats Abo-Foul i col.

(1996), també van observar la separació de la membrana plasmàtica de la paret cel·lular en la interacció incompatible en cogombre. En la plasmòlisi provocada per la interacció incompatible en cèl·lules vegetals hi intervé la translocació dels ions  $K^+$  i  $Ca^{2+}$ . En les cèl·lules vegetals en estat normal, el  $Ca^{2+}$  forma ponts entre la membrana plasmàtica i la paret cel·lular, mentre que en la reacció hipersensible la translocació de  $K^+$  provoca una reducció de l'adhesió en combinar-se aquest ió amb les càrregues negatives de la membrana plasmàtica prevenint la formació de ponts de  $Ca^{2+}$ .

L'observació microscòpica i de la ultraestructura dels teixits de fulla de perera infiltrats amb *P. syringae* en la situació compatible i la incompatible ha permès posar de manifest la localització dels bacteris, la interacció bacteri-planta i observar els canvis en les cèl·lules vegetals durant la interacció, podent diferenciar les dues situacions. Tot i això, els mecanismes de desenvolupament de la patogènia i de la reacció hipersensible així com els compostos i estructures implicades no han quedat clars. La utilització combinada de la microscòpia òptica i electrònica amb tècniques de serologia podria ajudar a conèixer l'origen i composició del material granular electrodens observat en la situació compatible (*P. syringae* pv. *syringae*) i de la matriu fibril·lar formada en la incompatible (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) en perera. De fet la combinació de la serologia amb la microscòpia ha estat utilitzada per diversos autors en l'estudi d'interaccions hoste-patogen en espècies vegetals. Vega i col. (1997) han utilitzat anticossos monoclonals per localitzar virus en talls ultrafins de teixits infectats de plantes; Askary i col. (1997) van marcar quitina amb aglutinina de germen de blat complexada amb or per observar la invasió de teixits de cogombre pel fong *Sphaeroteca fugilinea* i l'efecte de l'antagonista *Verticillium lecani* en la interacció; i Boher i col. (1996) van estudiar la interacció *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* en mandioca i aspectes de la patogènia del bacteri mitjançant la utilització d'anticossos monoclonals anti-pectina, i enzims ( $\beta$  1-4 exoglucanasa) marcats amb or.

Les observacions microscòpiques s'han correspost amb la dinàmica poblacional observada en cada una de les situacions: disminució de la població bacteriana en la incompatible i multiplicació en la compatible. En base a aquests resultats, tot i que els símptomes macroscòpics no s'observen de forma clara fins als 5 dies de les inoculacions, el desenvolupament de la malaltia i de la resposta hipersensible es produeixen ja en les 48 primeres hores, observant-se en aquest període de temps símptomes microscòpics clars i diferencials de cada tipus d'interacció.

## 5. Canvis en la permeabilitat cel·lular dels teixits de perera durant la interacció

En les condicions experimentals utilitzades, la interacció de bacteris fitopatògens virulents (*P. syringae*) en perera produeix canvis en la permeabilitat cel·lular de la planta hoste. Aquests canvis són diferents segons el tipus d'interacció. En la situació compatible (*P. syringae* pv. *syringae*) es produeix una ràpida i forta permeabilització de les cèl·lules dels discs de fulla infiltrats. En la situació incompatible (*P. syringae* pv. *tabaci*) la sortida d'electròlits és lenta i progressiva. En els dos tipus d'interaccions hi ha un període de temps (8-10 hores) en que no s'han observat canvis importants en la permeabilitat cel·lular ni diferències segons el tipus d'interacció. A partir de les 10 hores d'incubació la pauta de sortida d'electròlits ha estat clarament diferent segons la interacció. L'efecte de la interacció s'ha mantingut fins al final de la incubació, obtenint valors de conductivitat final significativament més elevats en la situació compatible que en la incompatible.

El període de temps que transcorre des de l'inici de la interacció fins que s'observen canvis en la permeabilitat cel·lular s'ha anomenat *període d'inducció* (Klement i Goodman, 1967b). El període d'inducció és característic (per a unes condicions experimentals determinades) de cada interacció hoste-patogen. En tabac, en la resposta hipersensible desenvolupada per *P. syringae* pv. *pisi*, el període d'inducció és de 6 hores (Goodman, 1972). El període d'inducció podria ser el temps necessari per a l'expressió de determinats gens (*hrp*), en concret per a sintetitzar els productes gènics (Goodman i Novacky, 1994). Es considera necessària la presència de bacteris vius per induir tant la reacció hipersensible com la malaltia, encara que només en la primera fase de contacte bacteri-planta, possiblement per a la transferència de molècules inductores de la HR (com les *harpines*). En perera, en les condicions utilitzades en aquest treball, el període d'inducció pel desenvolupament de la malaltia o la resposta hipersensible per part de *P. syringae* és de 8-10 hores.

En la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera s'observa un comportament diferencial en la sortida d'electròlits dels discs de fulla en funció de la virulència de la soca. La soca no virulenta (*P. syringae* pv. *syringae* 2831) no ha provocat canvis en la permeabilitat cel·lular, obtenint valors de conductivitat estables i similars als dels controls no infiltrats amb bacteris. Els canvis produïts en la permeabilitat cel·lular en infiltrar un bacteri fitopatogen avirulent són diferents segons l'espècie vegetal i el bacteri fitopatogen. Burkowicz i Goodman (1969) van observar que en inocular fulles de pomera amb una soca virulenta i una soca avirulenta d'*E. amylovora* els teixits desenvolupaven la mateixa

resposta en les dues situacions. La inoculació d'una soca natural avirulenta d'*E. amylovora* en perera no provoca canvis en la permeabilitat cel·lular de l'hoste, en canvi una soca mutant avirulenta no formadora d'EPS indueix una sortida d'electròlits similar a la d'una soca virulenta (Brisset, 1990).

En base a aquests resultats podem dir que la tècnica utilitzada permet correlacionar els canvis en la permeabilitat de la cèl·lula vegetal (sortida d'electròlits) amb el tipus d'interacció bacteri-planta (compatible, incompatible) i amb la virulència del patogen en la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera.

El fet que es produeixi una pauta diferencial de sortida d'electròlits de les cèl·lules vegetals segons el tipus d'interacció i virulència del patogen, juntament amb l'obtenció de valors de conductivitat baixos i estables en els discs foliars no infiltrats amb bacteris, fa pensar que la pèrdua d'electròlits i, per tant, els canvis en la permeabilitat de la membrana plasmàtica, són el resultat d'una interacció activa bacteri-planta. Klement i Goodman (1967a) van observar que pel desenvolupament de la resposta hipersensible, i la sortida d'electròlits de les cèl·lules vegetals, és necessària la interacció bacteri-planta durant les primeres hores. A partir d'aquest moment la resposta continua sense la presència de bacteris.

En la situació compatible de la majoria d'interaccions de bacteris fitopatògens (*P. syringae*, *E. amylovora*) en diferents hostes com tabac (Brisset i col., 1994) i mongetera (Atkinson i Baker, 1987), es produeix una sortida d'electròlits de les cèl·lules vegetals lenta i progressiva, mentre que en la interacció incompatible la sortida és forta i ràpida. En perera, en canvi, el patró de sortida d'electròlits és l'invers, és a dir, en la situació compatible (*P. syringae* pv. *syringae*) es produeix una sortida ràpida i forta d'electròlits i en la incompatible (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) es produeix una sortida lenta i progressiva. Aquest fet ha estat observat també en la interacció *E. amylovora*-perera (Brisset i col., 1994).

Tot i que la pauta de sortida d'electròlits de les cèl·lules vegetals és diferent segons l'espècie hoste, en cada cas es pot diferenciar la situació compatible/incompatible, soca virulenta/avirulenta. Això permet definir, per a un determinat hoste, els canvis en la permeabilitat cel·lular en una situació concreta.

Els canvis en la permeabilitat cel·lular de l'hoste durant la interacció amb el patogen han estat relacionats amb l'alliberació de molècules orgàniques i ions a l'espai

intercel·lular, provocant un canvi en el pH del medi extracel·lular (Atkinson i Baker, 1987; Brisset, 1990; Brisset i Paulin, 1991). Brisset (1990) va observar que la interacció *E. amylovora*-perera provoca la sortida d'elements nutritius (sucres) i ions minerals ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) de l'interior de la cèl·lula o de la paret cel·lular (calci i sucres). Aquests resultats són similars als observats per altres espècies vegetals. Atkinson i Baker (1987) van mostrar una associació entre la multiplicació de *P. syringae* pv. *syringae* i el desenvolupament dels símptomes foliars en mongetera, amb l'activació de l'intercanvi de  $K^+/H^+$  a nivell de la membrana plasmàtica (sortida de  $K^+$ , entrada de  $H^+$ ), lligat a un augment del pH de l'espai intercel·lular. Aquest flux permet l'acumulació de nutrients en l'espai intercel·lular (sacarosa, aminoàcids) i en conseqüència la multiplicació bacteriana. Atkinson i col. (1985a) també van observar en la interacció incompatible *P. syringae* pv. *pisi*-tabac el mateix tipus d'intercanvi de  $K^+/H^+$  a nivell de la membrana plasmàtica vegetal i un augment en el pH extracel·lular.

Els canvis en la permeabilitat cel·lular en l'hoste van lligats a la multiplicació bacteriana. Atkinson i Baker (1987) van observar que mutants de *P. syringae* pv. *syringae* que no tenien capacitat d'induir l'intercanvi  $K^+/H^+$  en mongetera no es multiplicaven en l'hoste, i que respostes febles, moderades o fortes anaven associades amb lents, moderats o ràpids augments poblacionals, respectivament. En tots els casos van observar que la inducció d'intercanvis  $K^+/H^+$  precedia un augment de la població bacteriana.

Un aspecte complementari, interessant d'estudiar en treballs futurs és la cinètica de sortida (o intercanvi) a nivell de la membrana plasmàtica de determinats ions com  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , de glúcids i els canvis en el pH extracel·lular durant la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera amb la finalitat de caracteritzar millor les diferents situacions. La determinació dels mecanismes de sortida dels diferents ions (difusió, transport actiu) i el seu origen permetria conèixer si la sortida d'electròlits és el resultat d'una desorganització de la membrana plasmàtica de la cèl·lula vegetal o si bé si és induïda de forma activa pel bacteri per provocar el flux de nutrients i ions a l'espai extracel·lular, aspecte que fins al moment no està clar.

Tant la patogènia com la resposta hipersensible produeixen canvis en la permeabilitat cel·lular, la diferència entre elles es troba principalment en la velocitat de resposta en cada cas. La mesura de la cinètica de sortida d'electròlits permet estudiar els mecanismes de patogènia de *P. syringae* pv. *syringae*.



Hem utilitzat models matemàtics per definir la cinètica de pèrdua d'electròlits de les cèl·lules vegetals en la interacció perera-*P. syringae*. El model utilitzat (model de cinètica monomolecular amb taxa de sortida d'electròlits variable en el temps) ha estat un bon model per diferenciar cada interacció. Els paràmetres que defineixen la taxa de sortida d'electròlits ( $K_0$  i  $b$ ) han estat significativament diferents en les situacions compatible/incompatible i soca virulenta/avirulenta. A partir de les equacions de cada situació concreta s'ha calculat el temps de pèrdua mitjana d'electròlits ( $t_{50}$ ). Aquest paràmetre defineix de forma clara la cinètica en cada interacció, permetent comparar i diferenciar les diverses situacions. En la situació compatible, en produir-se una ràpida i forta sortida d'electròlits dels teixits foliars de perera, s'obtenen temps de pèrdua mitjana d'electròlits baixos. En les 15 primeres hores d'incubació es produeix la sortida del 50% dels electròlits totals. En la situació incompatible els valors de  $t_{50}$  són més elevats, degut a que la sortida d'electròlits és lenta i progressiva, essent necessàries unes 30 hores per a la sortida de la meitat dels electròlits totals. Amb la soca avirulenta la sortida d'electròlits és tant feble (de fet no es pot considerar que hi hagi una sortida neta d'electròlits, al no observar diferències significatives amb els discs no infiltrats amb bacteris) que el  $t_{50}$  supera el temps d'incubació.

La utilització d'un model matemàtic per definir cada situació de la interacció hoste-patogen, i comparar-les quantitativament mitjançant els paràmetres  $k_0$ ,  $b$ , i  $t_{50}$ , serà útil per avaluar l'efecte dels fosfonats en la interacció *P. syringae* pv. *syringae* -perera utilitzant la tècnica de la pèrdua d'electròlits en teixits de fulla infiltrats amb *P. syringae*.

A partir dels resultats obtinguts en aquest capítol podem definir models d'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae* -perera basats en la utilització de plantes amb brots en creixement actiu de varietats sensibles (Conference), soques del patogen virulentes (EPS94), dosis d'inòcul d'entre  $10^7$  i  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> i condicions d'incubació definides i precises (20-25 °C i 70-80 % d'humitat relativa). Aquests models, juntament amb les metodologies i tècniques d'inoculació desenvolupades i/o avaluades seran utilitzats en la determinació de l'efecte dels fosfonats en la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera i en el control de la malaltia.

## CAPÍTOL 2

### ACTIVITAT DE DERIVATS DEL FOSFONAT EN LA INTERACCIÓ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*-PERERA

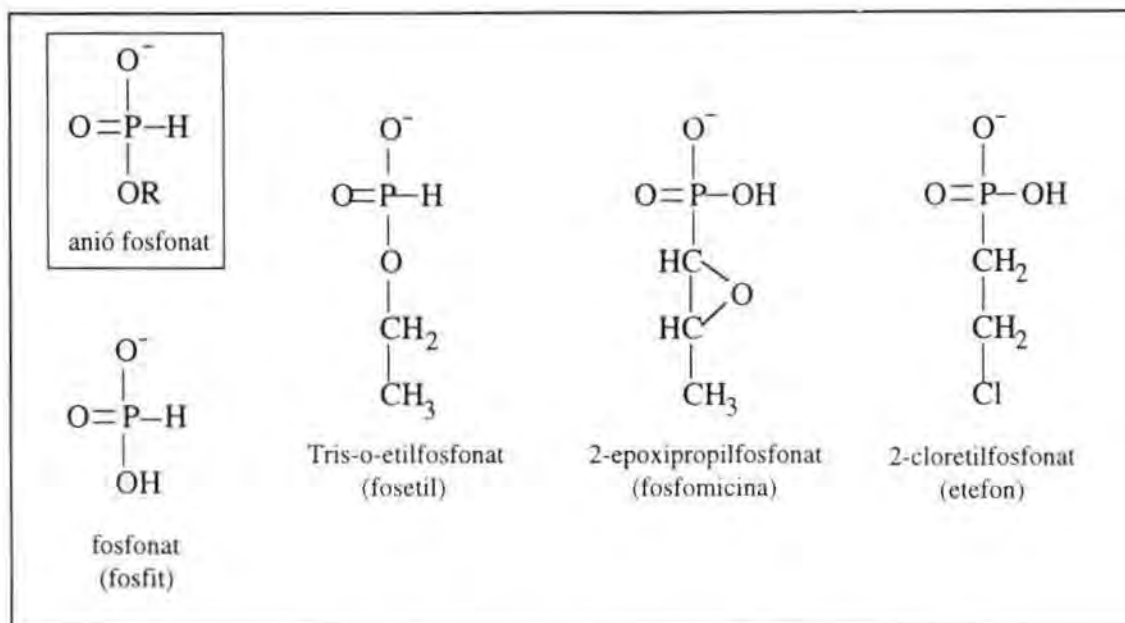
---

#### INTRODUCCIÓ

Els fosfonats són derivats de l'àcid fosfònic ( $H_3PO_3$ , també anomenat àcid fosforós), en concret sals o esters de l'àcid fosfònic (Figura 2.1). Tot i que també s'anomenen fosfonats els compostos amb un enllaç C-P (organofosfonats), aquests presenten propietats diferents respecte les sals i esters de l'àcid fosfònic. No es coneix la presència de sals i esters de l'àcid fosfònic en organismes vius. En canvi, de compostos amb enllaç C-P n'hi ha una gran varietat de naturals, presents en diferents grups d'organismes vius, i altres sintètics utilitzats en agricultura com el glifosat, utilitzat com a herbicida. En aquest treball en parlar de fosfonats es farà referència tant a les sals i esters de l'àcid fosfònic com als compostos amb enllaços C-P.

La utilització dels fosfonats en l'agricultura com a fungicides es va iniciar els anys 60 quan els químics de Rhône-Poulenc Agrochemie van observar que les sals del fosfonat eren molt efectives en front de malalties causades per oomicets (Bertrand i col., 1977). Fins al moment els fosfonats havien estat considerats com a compostos biològicament inerts (Guest i Grant, 1991). A partir d'aquest moment es va començar a provar d'utilitzar l'àcid fosfònic i els seus derivats com a fungicides, dels quals, el fosetil-Al (sal d'alumini formulada com Aliette WP, Rhône-Poulenc) va ser l'únic utilitzat comercialment. Inicialment el fosetil-Al va ser utilitzat pel control de fongs de l'ordre peronosporals, però s'ha mostrat actiu en front d'altres grups de fongs, i de bacteris i virus (Taula 2.1).

Els fosfonats són fungicides sistèmics que són translocats tant pel xilema com pel floema. Immediatament després de l'aplicació, el fosfonat és ràpidament absorbit per la planta i translocat pel xilema. A partir d'aquí es mou i transloca al floema (Groussol i col., 1986).



**Figura 2.1.** Estructura de l'anió fosfonat i de diferents derivats de l'àcid fosfònic.

**Taula 2.1.** Algunes malalties en les que els fosfonats, principalment el fosetil-Al, s'han mostrat efectius en el seu control

Patogen	Cultiu	Referència
<b>Fongs</b>		
<i>Phytophthora nicotianae</i>	pebrot	Guest, 1984
<i>P. citrophthora</i>	cítrics	Afek i Szejnberg, 1989
<i>P. citricola</i>	alvocat	El-Hamalawi i Menge, 1994
<i>P. cactorum</i>	pomera	Utkhede i Smith, 1995
<i>Rhizoctonia solani</i>	blat	Wehner i col., 1987
<i>Bremia lactucae</i>	enciam	Scherm i col., 1995
<b>Bacteris</b>		
<i>Erwinia amylovora</i>	perera	Paulin i col., 1990
<i>Xanthomonas campestris</i>	ornamentals	Chase, 1993
<i>X. arboricola</i> pv. <i>citri</i>	cítrics	McGuire, 1988
<b>Virus</b>		
Virus mosaic civada (AMV)	mongetera	Abu-Jawdah i Kummert, 1983
<b>Altres malalties</b>		
Necrosi de borrons de flor	perera	Montesinos i Vilardell, 1991a; 1996

La solubilitat en aigua, i mobilitat sistèmica del fosetil han fet que s'hagin utilitzat diverses formes d'aplicació pel control de diferents malalties fúngiques. S'han realitzat aplicacions foliars per polvorització (Utkhede i Smith, 1995), radiculars (Wehner i col., 1987; El-Hamalawi i Menge, 1994) i injeccions o pintures directament en el tronc (El-Hamalawi i Menge, 1994; El-Hamalawi i col., 1995).

En diversos treballs s'ha mostrat que els alquilfosfonats són degradats en la planta i que l'ió fosfonat és el principi actiu (Bompeix i col., 1980; Coffey i Joseph, 1985; Fenn i Coffey, 1984, 1985; Dolan i Coffey, 1988). Això ha portat a considerar també les sals simples de l'àcid fosfònic com a compostos amb possible activitat antifúngica. De fet, diferents experiments han mostrat la seva activitat en el control de malalties fúngiques (Fenn i Coffey, 1984, 1985; Cohen i Coffey, 1986; Dolan i Coffey, 1988; Afek i Szejnberg, 1989; Ouimette i Coffey, 1989), però aquests productes només són comercialitzats legalment com a fungicides a Austràlia. En la resta de països, productes com el fosfonat potàssic són comercialitzats com a agroquímics (en concret a l'estat espanyol es comercialitza com adob), però no com a fungicides.

La majoria d'experiments per a conèixer els mecanismes d'actuació dels fosfonats s'han realitzat en el control de malalties fúngiques (Bompeix i col., 1980; Fenn i Coffey, 1984; 1985; Coffey i Joseph, 1985; Dolan i Coffey, 1988). A partir d'aquests treballs s'han determinat alguns aspectes de l'activitat antifúngica dels fosfonats, resumits per Guest i Grant (1991) en els següents punts. En cultius tractats amb fosetil la protecció continua fins i tot quan ja no es detecten residus de fosfonats en els teixits de la planta. Això s'explica per la degradació de l'alquilfosfonat en àcid fosfònic en l'interior de la planta. Les concentracions de fosfonat o etilfosfonat trobades en els teixits protegits de les plantes són inferiors a les  $DE_{50}$  determinades *in vitro*. Les concentracions d'alquilfosfonat necessàries per inhibir el creixement fúngic en cultiu axènic són molt superiors a les d'altres fungicides sistèmics com benzimidazols i triazols. A més, l'espectre antifúngic dels alquilfosfonats en el laboratori està poc correlacionat amb l'activitat observada a camp.

Altres autors van observar que l'aplicació de fosfonats activa sistemes dinàmics de defensa de la planta. Alguns mecanismes estimulats per l'acció del fosetil-Al són característics dels desenvolupament de la resposta hipersensible, com la formació de necrosis bloquejades limitant l'extensió de la infecció i de les lesions (Bompeix i col. 1980, 1981), ràpids canvis citològics com migració del nucli, deposició de vesícules, mort cel·lular (Guest, 1986), biosíntesi d'etilè, activació de la fenilalanina amoni liasa

(PAL) i lignificació i acumulació de fitoalexines (Afek i Szejnberg, 1989; Nemestothy i Guest, 1990). Aquestes característiques han portat a formular la hipòtesi que els fosfonats actuen estimulant mecanismes naturals de defensa de la planta hoste després de la infecció. Sembla ser que els alquilfosfonats són capaços de provocar una resposta de resistència a la infecció en hostes susceptibles, però el mecanisme pel qual els fosfonats estimulen respostes de defensa en la planta és desconegut.

Alguns autors (Cohen i Coffey, 1986; Fenn i Coffey, 1985, 1989) consideren que els fosfonats tenen una acció fungicida directa a través de l'àcid fosfònic que actua sobre alguns fongs inhibint el creixement miceliar i la formació d'espores. Dustan i col. (1990) van observar que l'àcid fosfònic altera la composició i estructura de la membrana plasmàtica i la paret cel·lular de certs fongs. Això redueix la virulència del fong en la planta hoste i com a conseqüència aquest queda exposat a les defenses de la planta en les etapes inicials de la infecció.

Fins al moment per tant, la forma d'actuació dels fosfonats en el control de malalties fúngiques no està clara, podent actuar directament sobre el fong o bé en la planta estimulant mecanismes de defensa, o de les dues formes.

Tot i observar que l'àcid fosfònic té la mateixa activitat que el fosetil-Al, la majoria d'experiments s'han realitzat amb fosetil-Al. En pocs d'ells s'han comparat les sals i els alquils de l'àcid fosfònic. És d'esperar que hi hagi diferències entre les sals i els esters del fosfònic en front de diverses malalties, com a resultat de les diferents taxes d'assimilació i transport dins la planta i, en el cas dels alquilfosfonats, de les taxes de metabolització en cada espècie vegetal. El catió associat a l'alquilfosfonat pot mostrar activitat antifúngica complementària (Guest i Grant, 1991).

La forma d'actuació dels fosfonats en el control de malalties bacterianes en plantes no es coneix, tot i que el fosetil-Al s'ha mostrat actiu en el control diferents bacteris fitopatògens (Taula 2.1). Tant el fosetil-Al com el fosfonat potàssic s'han mostrat efectius en el control de la necrosi de borrons de flor de la perera (Montesinos i Vilardell 1991a; 1996) en experiments realitzats en condicions de camp.

El coneixement d'aspectes bioquímics de l'activitat antimicrobiana dels fosfonats, pot ajudar a entendre aspectes de la interacció hoste-patogen en malalties en les que són actius. Addicionalment pot ajudar al control de malalties en que són poc efectius fins al moment, i a la ubicació i cadència dels tractaments per millorar-ne l'eficàcia.

En concret, el coneixement de l'activitat i de la forma d'acció de derivats de l'àcid fosfònic en el control de *P. syringae* pv. *syringae* en perera pot ser útil per millorar el control de la malaltia. Si aquests productes es mostren efectius, es podran utilitzar estratègies de control integrat que combinin la utilització de varietats resistents, mesures culturals i productes químics de tercera o quarta generació.

Per a l'estudi de l'acció i eficàcia dels fosfonats en el control de *P. syringae* pv. *syringae* en perera s'ha considerat interessant avaluar i comparar l'activitat de varis fosfonats. S'han escollit quatre productes (derivats de l'àcid fosfònic): fasetil-AI, fosfonat potàssic, fosfomicina i etefon. Aquests compostos presenten diferent estructura i composició química (Figura 2.1), i tenen diverses aplicacions en agricultura i/o en el control de malalties microbianes en plantes o animals.

El fasetil-AI és el producte que ha estat més estudiat, per l'activitat que presenta en el control de malalties fúngiques i bacterianes en plantes (Taula 2.1).

El fosfonat potàssic és una sal de l'àcid fosfònic, utilitzat com a adob en agricultura, i que en diversos experiments ha mostrat activitat antifúngica (Fenn i Coffey, 1984, 1985; Ouimette i Coffey, 1989).

La fosfomicina és un derivat de l'àcid fosfònic que presenta en la seva estructura un enllaç C-P i un grup epoxi (Kuzuyama i col., 1992). És un antibiòtic molt utilitzat en clínica en front d'infeccions sistèmiques produïdes per bacteris Gram positius i Gram negatius. Té activitat bactericida afectant la integritat de la paret cel·lular bacteriana (Hendlin i col., 1969). La fosfomicina és sintetitzada per diverses espècies de *Streptomyces*, per *Pseudomonas syringae* i per *Pseudomonas viridiflava* (Kuzuyama i col., 1992).

L'etefon és un agent alliberador d'etilè. L'etilè és una fitohormona sintetitzada per les plantes en condicions d'estrès i processos de senescència (Oeller, 1991; Picton i col., 1993; Mohr i Schopfer, 1995). També produeixen etilè alguns bacteris fitopatògens com diferents patovars de *P. syringae* en la planta durant el procés d'infecció (Weingart i Völksch, 1997). Recentment s'ha observat que el tractament de plantes amb etefon indueix l'expressió gènica de la resistència sistèmica adquirida (SAR) a través de la síntesi de l'àcid salicílic (Lawton i col., 1994).

La determinació de l'activitat antibacteriana *in vitro* d'aquests compostos, i el coneixement de la seva activitat en el desenvolupament de mecanismes de defensa o de resistència en perera davant la infecció de *P. syringae* pv. *syringae*, permetran millorar el control de la malaltia. A la vegada aquests estudis poden aportar noves dades per entendre millor la forma d'actuació dels fosfonats en general.

La utilització dels models i metodologies per a l'estudi de la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera, desenvolupats en el capítol anterior, permetrà estudiar l'activitat d'aquests fosfonats en el bacteri fitopatogen, en la planta i en la interacció bacteri-planta.

## OBJECTIUS

L'objectiu central d'aquest capítol ha estat determinar l'activitat de diferents fosfonats en el control de la infecció i desenvolupament de la malaltia causada per *P. syringae* pv. *syringae* en perera. Per això s'ha estudiat l'efecte dels fosfonats en els següents aspectes concrets de la interacció *P. syringae* pv. *syringae* -perera:

- 1) Efecte en la virulència i multiplicació de *P. syringae* pv. *syringae* en perera, i canvis estructurals i de permeabilitat cel·lular produïts en els teixits de la planta durant la interacció.
- 2) Inhibició de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera, comparant l'eficàcia dels diferents productes i de les dosis, cadències i formes d'aplicació.
- 3) Activitat antibacteriana *in vitro* dels fosfonats.

## MATERIAL I MÈTODES

### 1. Efecte dels fosfonats en la virulència de *P. syringae* pv. *syringae* en plantes de perera

#### 1.1. Material vegetal i tractaments amb fosfonats

Es van utilitzar plantes de perera de la varietat Conference autoarrelades i clonades (clon CAV) obtingudes per micropropagació (Agromillora Catalana, S.A., Barcelona). Aquestes plantes tenien 2 anys i estaven en contenidors de plàstic d'1 l. Es van forçar a brotar 2 mesos abans de l'experiment per obtenir brots joves i en creixement actiu. Durant la brotació es van mantenir en hivernacle i es van fertilitzar setmanalment amb una solució de 200 ppm de N-P-K (20-10-20). Durant el mes anterior a l'inici de l'experiment les plantes es van fertilitzar només amb N-K (20-20), per evitar la interferència del fosfat amb els fosfonats utilitzats en els tractaments experimentals.

La setmana anterior a les inoculacions les plantes es van regar diàriament durant 5 dies amb 100 ml de solucions aquoses de fosetil-Al (Alerte<sup>®</sup>, Rhône Poulenc Agro, France), fosfonat potàssic (Alexin95 PS<sup>®</sup>, Comercial Química Massó S.A., Barcelona), etefon (Ethrel48<sup>®</sup>, Compagnie Française des Produits Industrielles, France) i fosfomicina (sal sòdica, Fermentaciones y Síntesis Españolas S.A., Madrid) a la concentració d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  l<sup>-1</sup>. La concentració dels diferents fosfonats s'expressa en equivalents de  $\text{HPO}_3^{2-}$  per permetre la comparació entre productes. La quantitat d'ingredient actiu aplicat per producte es pot calcular multiplicant les concentracions de  $\text{HPO}_3^{2-}$  pels factors de conversió corresponents: 1.38 pel fosetil-Al, 1.02 pel fosfonat potàssic, 1.81 per l'etefon i 1.73 per la fosfomicina.

Després del tractament amb els fosfonats les plantes es van deixar dos dies sense regar (per assegurar l'absorció total dels productes) i a continuació es va procedir a les inoculacions amb el patogen. La quantitat de fosfonats total aplicada per planta va ser de 0.93 g  $\text{HPO}_3^{2-}$ . Com a control no tractat amb fosfonats es van regar plantes amb aigua destil·lada. Mentre es van realitzar els tractaments amb fosfonats les plantes es van mantenir en l'hivernacle.



## 1.2. Inòcul

Es van inocular suspensions en aigua destil·lada estèril d' $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> de la soca EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* (veure Taula 1.2). Les suspensions es van preparar a partir de cultius purs del bacteri crescuts en agar B de King (King i col., 1954) durant 24 h a 25 °C. L'ajust i determinació de la concentració de les suspensions es va realitzar tal com s'ha descrit en el capítol anterior (pàg. 34).

## 1.3. Inoculacions i incubació

Les inoculacions es van realitzar en la planta sencera, seguint la tècnica de microinfiltració localitzada en les fulles descrita en el capítol anterior (pàg. 42). Es van inocular totes les fulles de la planta. A cada fulla es van infiltrar les tres dosis de patogen, amb dues inoculacions de 50 µl per dosi (una a cada costat del nervi principal). Com a control es van inocular plantes amb aigua destil·lada estèril.

Les plantes inoculades es van incubar durant 5 dies en una cambra d'ambient controlat (model PGR15, Conviron, Winnipeg, Manitoba, Canadà) a 25°C, 16 hores llum i 18 °C, 8 hores a fosc, i humitat relativa del 70-80%. Durant la incubació les plantes es van regar amb aigua destil·lada (Figura 2.2).

## 1.4. Disseny experimental

Es van realitzar dos experiments. En el primer experiment es va avaluar l'efecte del fosetil-Al en la virulència del patogen i en el segon experiment es va avaluar i comparar l'efecte de diferents fosfonats (fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina). En els dos experiments es va utilitzar un disseny factorial totalment aleatoritzat, amb dos factors (fosfonats i dosi de patogen). Cada tractament va constar de tres repeticions de tres plantes.

## 1.5. Avaluació de la virulència del patogen

Es va avaluar la presència de símptomes i la severitat de la infecció en cada una de les inoculacions als 5 dies de la incubació de les plantes en la cambra d'ambient controlat.

Per mesurar la intensitat de les infeccions es van utilitzar els índexs de severitat ( $I_s$ ) descrits en el capítol anterior (Taula 1.5).

Per cada dosi d'inòcul es va calcular la severitat de la malaltia per planta ( $S_p$ ) a partir dels índexs de severitat de la infecció ( $I_s$ ) de totes les inoculacions realitzades en la planta amb cada dosi. Es va utilitzar la següent fórmula:

$$S_p = \frac{\sum_{j=1}^N I_s j}{N \times 3} \times 100$$

on:  $S_p$ : Severitat de la malaltia per planta  
 $I_s$ : Índex de severitat de la infecció (de 0 a 3)  
 $j$ : Inoculació en la planta  
 $N$ : Nombre d'inoculacions per planta i dosi de patogen

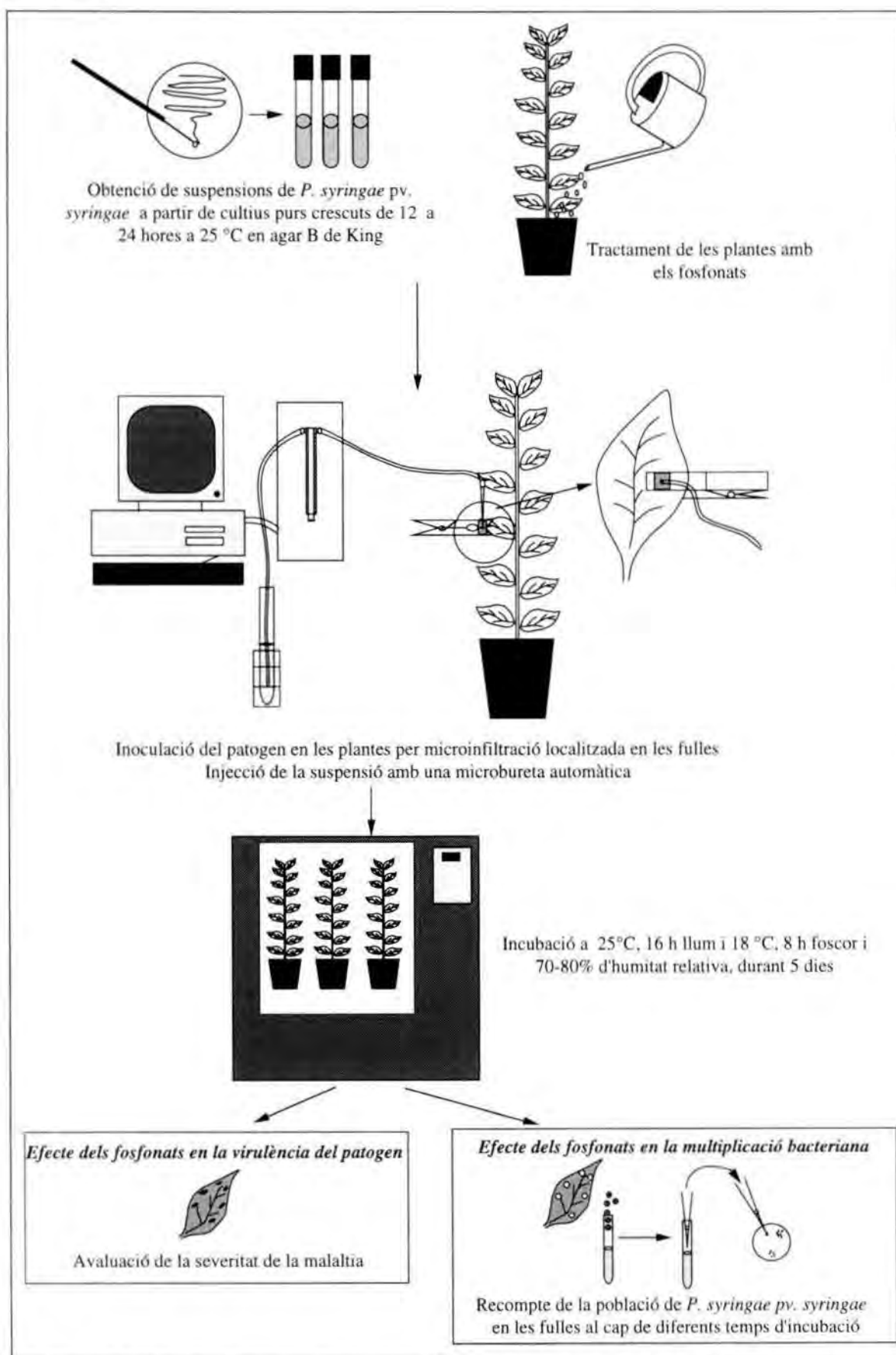
## 1.6. Anàlisi estadística

Per cada un dels experiments es va comprovar l'homogeneïtat de les variàncies de la severitat de la malaltia dels diferents tractaments amb la prova de Bartlett i la distribució normal dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk.

Es va determinar l'efecte del fosfonat, de la dosi d'inòcul i de la interacció fosfonat-dosi en la severitat de la malaltia mitjançant una anàlisi de la covariància (ANCOVA). Es va utilitzar la severitat de la malaltia per planta (o la transformació en Probit ( $S_p/100$ )) com a variable dependent, el tipus de fosfonat aplicat com a variable independent i la dosi d'inòcul ( $\text{Log}_{10}$  (ufc  $\text{ml}^{-1}$ )) com a covariable. L'efecte dels tractaments es va avaluar amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ).

Per cada experiment es va relacionar la dosi de patogen amb la severitat de la malaltia mitjançant el mètode de regressió lineal simple, considerant la dosi de patogen (transformada en  $\text{Log}_{10}$ ) com a variable independent i la severitat de la malaltia (Probit( $S_p/100$ )) com a variable dependent. Les rectes de regressió obtingudes es van avaluar mitjançant el coeficient de determinació ( $R^2$ ) i el grau de significació ( $(P>F)<0.05$ ). Amb les equacions que van presentar un bon ajust es van calcular les dosis de patogen necessàries per obtenir nivells de severitat de la malaltia del 50% ( $\text{DE}_{50}$ ) i del 90% ( $\text{DE}_{90}$ ).

Els tractaments estadístics es van realitzar amb el paquet d'aplicacions estadístiques JMP per Macintosh (JMP 2.0, SAS Institute Inc.).



**Figura 2.2.** Procediment utilitzat per a la determinació de l'efecte dels fosfonats en la multiplicació i virulència de *P. syringae* pv. *syringae* en perera.

## **2. Efecte dels fosfonats en la multiplicació de *P. syringae* pv. *syringae* en plantes de perera**

### **2.1. Material vegetal i tractament amb fosfonats**

Es van utilitzar plantes de perera de la varietat Conference autoarrelades i clonades (clon CAV) obtingudes per micropropagació (Agromillora Catalana, S.A., Barcelona) de les mateixes característiques que en la determinació de l'efecte dels fosfonats en la virulència de *P. syringae* pv. *syringae*. Les plantes es van forçar a brotar i es van mantenir en hivernacle i fertilitzar tal com s'ha descrit en l'apartat 1.1 (pàg. 139).

La setmana anterior a les inoculacions les plantes es van regar diàriament durant 5 dies amb 100 ml de solucions aquoses de fasetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina a una concentració d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  l<sup>-1</sup>. Els tractaments amb els productes es van realitzar tal com s'ha descrit en l'apartat anterior. Es van regar plantes amb aigua destil·lada que serien utilitzades com a control no tractat amb fosfonats.

### **2.2. Inòcul**

Es va utilitzar el bacteri *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 (veure referència a la Taula 1.2). Es van inocular suspensions en aigua destil·lada estèril d'1x10<sup>7</sup> i 1x10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup>. Les suspensions es van preparar com s'ha descrit anteriorment (pàg. 34).

### **2.3. Inoculacions i incubació**

Les inoculacions es van realitzar en la planta sencera per microinfiltració localitzada en les fulles de 50 µl de la suspensió bacteriana utilitzant la tècnica descrita en el capítol anterior (pàg. 42). Es van inocular totes les fulles de la planta amb les dues dosis de patogen, realitzant tres inoculacions amb cada dosi per fulla. En total a cada fulla es van fer 6 inoculacions, tres a cada costat del nervi principal. Addicionalment es van inocular plantes de tots els tractaments amb aigua destil·lada estèril.

Les plantes inoculades es van incubar durant 5 dies en una cambra d'ambient controlat (model PGR15, Conviron, Winnipeg, Manitoba, Canadà) a 25°C, 16 hores llum

i 18 °C, 8 hores fosc, i humitat relativa del 70-80%. Durant la incubació les plantes es van regar amb aigua destil·lada (Figura 2.2).

#### **2.4. Avaluació de la supervivència i multiplicació dels bacteris en les plantes de perera**

El recompte de bacteris en el teixit vegetal (ufc mm<sup>-2</sup> fulla) es va fer a les 0, 24 i 48 hores de les inoculacions. Es va seguir el procediment descrit a l'apartat 3.2.4 (pàg. 46).

#### **2.5. Disseny experimental**

Es va realitzar un disseny factorial totalment aleatoritzat amb tres factors (tractament amb fosfonats, dosi d'inòcul i temps d'incubació). Les plantes inoculades amb aigua destil·lada estèril es van considerar com a controls. Cada tractament va constar de tres repeticions de tres plantes cadascuna.

#### **2.6. Anàlisi estadística**

Es va comprovar l'homogeneïtat de les variàncies del nombre de bacteris viables (Log<sub>10</sub> ufc mm<sup>-2</sup> fulla) dels diferents tractaments amb la prova de Bartlett i la distribució normal dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk.

L'efecte dels factors i la interacció en la multiplicació bacteriana es va determinar mitjançant una anàlisi de la covariància (ANCOVA) en la que la dosi de patogen i el temps d'incubació, en ser variables quantitatives, es van considerar com a covariables.

Els tractaments estadístics es van realitzar amb el paquet d'aplicacions estadístiques JMP per Macintosh (JMP 2.0, SAS Institute Inc.).

### **3. Efecte dels fosfonats en els canvis estructurals en els teixits de fulla de perera durant la interacció amb *P. syringae* pv. *syringae***

Es va fer un seguiment visual de l'aparició de símptomes i infeccions durant la incubació de les plantes tractades amb fosfonats i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae*. A les 48 hores de les inoculacions es van agafar mostres de teixit vegetal de la zona inoculada amb el patògen a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>. Per cada tractament es van agafar 6 discs de fulla de 0.5 cm de diàmetre de la zona infiltrada amb els bacteris i es van processar per a l'observació al microscopi òptic i al microscopi electrònic de rastreig i de transmissió, seguint el procediment descrit a l'apartat 3.3 del capítol anterior (pàg. 47).

### **4. Efecte dels fosfonats en la permeabilitat de discs foliars durant la interacció amb *P. syringae***

Es van mesurar els canvis en la permeabilitat de discs foliars de diverses espècies vegetals en infiltrar bacteris que desenvolupessin diferents reaccions (compatible, incompatible o cap resposta). En concret es van estudiar els canvis en la permeabilitat cel·lular en plantes de tabac, perera i mongetera inoculades amb patògens virulents de cada una d'elles, patògens avirulents, patògens d'altres espècies vegetals virulents, patògens d'altres espècies vegetals avirulents i bacteris no fitopatògens (Taula 2.2). Per les diferents combinacions es va determinar l'efecte del tractament previ de les plantes amb fosfonats en els canvis en la permeabilitat cel·lular durant la interacció amb els bacteris. Els resultats es van comparar amb els canvis de permeabilitat en plantes sense tractar amb fosfonats i inoculades amb els bacteris.

#### **4.1. Material vegetal**

Es van utilitzar plantes de tabac (*Nicotiana tabacum*) de la varietat Xanthi, de perera (*Pyrus communis*) de la varietat Passe Crassane i de mongetera (*Phaseolus vulgaris*) de les varietats Coco nana, Dorabel, Michelet i Vaillant. Totes les plantes es van obtenir de llavor i es van cultivar i mantenir en hivernacle fins la realització de les inoculacions. Per realitzar els tractaments amb fosfonats i les inoculacions amb els

**Taula 2.2.** Interaccions bacteri-planta i tipus de resposta desenvolupada en l'experiment per a la determinació de l'efecte dels fosfonats en la permeabilitat cel·lular de discs foliars de diferents plantes

<i>Bacteri</i>		<i>Planta hoste</i> (sensibilitat al patogen) <sup>c</sup>	<i>Resposta</i> <sup>d</sup>
<i>Soca</i> <sup>a</sup>	<i>Característiques patogèniques</i> <sup>b</sup>		
<i>E. amylovora</i> 1430	Patògena (V perera)	<i>Pyrus communis</i> var. Passe Crassane (S)	Compatible
<i>E. amylovora</i> 6046	Mutant no patògena (AV perera, no HR tabac)	<i>Pyrus communis</i> var. Passe Crassane	No resposta
<i>E. amylovora</i> 6070	Mutant (AV perera, HR tabac)	<i>Pyrus communis</i> var. Passe Crassane	No resposta
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Patògena (V mongetera).	<i>Phaseolus vulgaris</i> vars. Coco (S), Michelet (S), Dorabel (R) i Vaillant (R)	Compatible o incompatible
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	Patògena (V perera, HR tabac i HR mongetera)	<i>Pyrus communis</i> var. Passe Crassane (S) <i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi <i>Phaseolus vulgaris</i> vars. Coco, Dorabel, Michelet, Vaillant	Compatible Incompatible Incompatible
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831	Patògena (AV perera, HR tabac)	<i>Pyrus communis</i> var. Passe Crassane <i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi	Incompatible Incompatible
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	Patògena. (HR perera, V tabac)	<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi (S) <i>Pyrus communis</i> var. Passe Crassane	Compatible Incompatible
<i>P. fluorescens</i> 88.1	No patògena	<i>Pyrus communis</i> var. Passe Crassane <i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi	No resposta No resposta

<sup>a</sup> Bacteris procedents de l'INRA d'Angers (França) descrits a la Taula 2.3  
<sup>b</sup> Característiques patogèniques de cada soca en les espècies vegetals inoculades: V (virulenta, desenvolupa malaltia), AV (avirulenta, no desenvolupa malaltia), HR (desenvolupa hipersensibilitat en l'hoste inoculat) i no patògena (no es coneix que desenvolupi malaltia en cap espècie vegetal ni hipersensibilitat en tabac)  
<sup>c</sup> Sensibilitat de la varietat al bacteri inoculat (S:sensible, R:resistent)  
<sup>d</sup> Resposta desenvolupada en l'hoste en inocular el bacteri: compatible (desenvolupa malaltia), incompatible (desenvolupa resposta hipersensible) i no resposta (ni malaltia ni hipersensibilitat)

bacteris es van utilitzar plantes joves, amb fulles tendres i brots en creixement actiu, d'un mes en el cas de perera i de 15 dies a 1 mes en el cas de mongetera i tabac.

#### 4.2. Tractament de les plantes amb fosfonats

En tabac i perera es van realitzar tractaments amb solucions aquoses de fosetil-Al a la dosi d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{l}^{-1}$ . Les plantes es van tractar diàriament durant els quatre dies anteriors i el mateix dia de les inoculacions per polvorització fins caiguda de gota en l'anvers i el revers de totes les fulles.

En mongetera es van realitzar tractaments amb solucions aquoses d'etefon, fosetil-Al i fosfomicina a la dosi d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{l}^{-1}$ . El fosetil-Al es va aplicar regant les plantes diàriament els dos dies previs a les inoculacions amb 100 ml de la solució i polvoritzant les fulles fins caiguda de gota amb la solució del producte el mateix dia de les inoculacions. Els tractaments amb fosfomicina es van realitzar els dos dies anteriors a les inoculacions i el mateix dia de les inoculacions polvoritzant diàriament totes les fulles per l'anvers i el revers fins caiguda de gota. L'etefon es va aplicar de dues formes diferents, regant i polvoritzant. En les plantes en que es van aplicar per via radicular es va procedir de la mateixa manera que en els tractaments realitzats amb fosetil-Al. En les que es van realitzar les aplicacions per via foliar es va procedir de la mateixa manera que en les plantes en que es va aplicar fosfomicina.

En tots els experiments es van utilitzar plantes regades amb aigua destil·lada com a control. Durant els tractaments les plantes es van mantenir en hivernacle (en les mateixes condicions en que s'havien fet créixer).

#### 4.3. Inòcul

Es van utilitzar diferents bacteris fitopatògens i no fitopatògens en funció de l'espècie vegetal i de la resposta que es pretenia observar (Taula 2.2). L'inòcul es va preparar a partir de cultius purs de les soques bacterianes crescuts durant 24 h a 25 °C en agar B de King (King i col., 1954). Es van preparar suspensions d' $1 \times 10^9$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  de cada soca en amortidor MES (àcid 2-[N-morfino] etanosulfònic) 0.5 mM + CaCl 0.5 mM (pH 6) tal com s'ha descrit en l'apartat 4.2 del capítol 1 (pàg. 48).



**Taula 2.3.** Procedència dels bacteris utilitzats en la determinació dels canvis en la permeabilitat de discs foliars de diferents plantes

<i>Bacteri</i>	<i>Hoste</i> <sup>a</sup>	<i>Procedència</i> <sup>b</sup>
<i>Erwinia amylovora</i> 1430	<i>Crataegus</i> sp.	CFBP
<i>E. amylovora</i> 6070 <sup>c</sup>	<i>Pyrus communis</i>	PMV
<i>E. amylovora</i> 6046 <sup>c</sup>	<i>Pyrus communis</i>	PMV
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 88.1	<i>d</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	<i>Pyrus communis</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831	<i>Pyrus communis</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	<i>Nicotiana tabacum</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	<i>Phaseolus vulgaris</i>	CFBP

<sup>a</sup> Hoste del que es va aïllar cada soca (*d*: desconegut)

<sup>b</sup> CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA Angers (France)  
PMV: Laboratoire de Pathologie Moleculaire et Végétale INRA/INA-PG, Paris (France)

<sup>c</sup> Mutants per transposició de la soca *E. amylovora* 1430

#### 4.4. Infiltració de les suspensions bacterianes en el material vegetal

La infiltració dels bacteris es va realitzar en discs de fulles de plantes de les diferents espècies vegetals. En les infiltracions en perera i tabac es van utilitzar les fulles basals de les plantes i en mongetera la tercera i quarta fulles. La infiltració de les suspensions bacterianes en els discs de fulla es va realitzar seguint la tècnica desenvolupada per Brisset (1990) descrita a l'apartat 4.3 pàg. 49. Com a control no inoculat amb bacteris es van infiltrar discs amb amortidor MES (àcid 2-[N-morfino] etanosulfònic) 0.5 mM + CaCl 0.5 mM (pH 6).

#### 4.5. Recompte de la quantitat de bacteris infiltrats per disc de fulla

Per cada tractament i repetició es van agafar 3 discs de fulla acabats d'infiltrar amb les suspensions bacterianes i deixats eixugar en la campana de flux laminar, i es van triturar i homogeneïtzar en 2 ml d'aigua destil·lada estèril. Es van fer dilucions 1:10 en aigua destil·lada estèril de l'homogeneïtzat i es van sembrar les dilucions  $10^{-2}$  i  $10^{-3}$  en plaques Petri amb agar B de King (King i col., 1954). Les plaques es van col·locar

durant 48 hores a 25° C i es va fer el recompte de colònies calculant el nombre de bacteris infiltrats per disc.

#### **4.6. Incubació dels discs de fulla infiltrats amb bacteris**

Per cada tractament i repetició es van col·locar 5 discs de fulla infiltrats en tubs que contenien 10 ml d'amortidor MES 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM (pH 6) i es van incubar a 25° C, en presència de llum ( 8000 Lux) i en agitació durant 24 a 48 h.

#### **4.7. Determinació dels canvis de permeabilitat cel·lular**

Els canvis en la permeabilitat cel·lular es van quantificar mesurant la conductivitat de les solucions d'incubació dels discs de fulla infiltrats amb les suspensions bacterianes o amb la solució d'amortidor. En els experiments realitzats en mongetera es van efectuar lectures a l'inici de la incubació i cada hora durant tot el període d'incubació. En perera i tabac les lectures es van fer cada dues hores durant les 6-8 primeres hores d'incubació i cada 4-12 hores durant la resta de la incubació. La mesura de la conductivitat es va realitzar manualment en perera i tabac utilitzant un conductímetre manual (XE 170, Hanna Instruments) i de forma automàtica amb microconductímetres de platí controlats per ordinador (PC) en els experiments realitzats en mongetera. En aquests experiments es va programar la cadència de lectura de la conductivitat de les solucions i la mesura va quedar enregistrada automàticament en disc.

En cada experiment es va determinar la conductivitat màxima de la mostra tal com s'ha descrit en el capítol anterior (pàg. 52).

#### **4.8. Disseny experimental**

En cada experiment les plantes utilitzades eren homogènies, de la mateixa edat i havien estat sotmeses a les mateixes condicions ambientals i van ser regades amb les mateixes solucions nutritives i amb igual cadència.

En tots els experiments es va realitzar un disseny multifactorial totalment aleatoritzat, amb diferents factors (soca bacteriana, varietat de planta hoste i tractament

amb fosfonats) segons l'experiment. Cada tractament va constar de 4 repeticions en els experiments realitzats en perera i tabac, i de 2 o 3 repeticions en els realitzats en mongetera.

#### 4.9. Tractament de les dades i anàlisi estadística

En cada experiment es va restar la conductivitat inicial de la mostra als valors de conductivitat corresponents a cada temps. D'aquesta manera tots els tractaments d'un experiment partien dels mateixos valors de conductivitat inicial. Això va permetre per una banda, eliminar part de la variabilitat de la repetició deguda al processat, i per l'altra comparar els diferents tractaments. Totes les anàlisis estadístiques es van realitzar amb els valors de conductivitat modificats respecte la conductivitat inicial.

##### *Anàlisi cinètica de la pèrdua d'electròlits*

Per analitzar la cinètica de pèrdua d'electròlits en cada tractament es va utilitzar el model matemàtic de cinètica monomolecular amb taxa de sortida d'electròlits variable en el temps, descrit en el capítol anterior (equació 5 pàg. 52). Els paràmetres que defineixen la taxa de sortida d'electròlits del model ( $K_0$  i  $b$ ) es van estimar per cada tractament i repetició mitjançant el mètode de Gauss-Newton, tal com s'ha descrit en el capítol anterior (pàg. 52).

Per iniciar les iteracions i estimar els valors dels dos paràmetres en el model matemàtic es van fixar els valors inicials  $K_0=0$  i  $b=0$ . També va ser necessari fixar prèviament el valor màxim de conductivitat de cada experiment ( $C_{max}$ ). El valor màxim de conductivitat ( $C_{max}$ ) es va determinar mesurant la conductivitat de la solució d'incubació dels discs infiltrats al final de la incubació, després d'haver-los sotmès a un tractament de congelació i descongelació (*conductivitat total*) (pàg. 52). Es va utilitzar com a conductivitat màxima el valor de conductivitat total significativament superior segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer. En cas de no haver-hi diferències significatives entre tractaments, es va utilitzar la mitjana de la conductivitat total de tots els tractaments. En els experiments en que no es va poder mesurar la conductivitat total de les mostres es va utilitzar com a valor de conductivitat màxima la conductivitat al final de la incubació, del tractament o tractaments que donessin valors

significativament superiors a la resta de tractaments segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ).

De cada model obtingut es va determinar la bondat d'ajust dels valors observats als predits (coeficient de determinació  $R^2$ ), la significació ( $P>F$ ) i la normalitat dels residus mitjançant la prova de Shapiro-Wilk.

En cada experiment, per determinar l'efecte del tractament (interacció bacteri-planta i/o tractament de les plantes amb fosfonats) en la sortida d'electròlits es van comparar els següents paràmetres:

- 1) la conductivitat al final de la incubació dependent del tractament
- 2) la taxa de sortida d'electròlits, definida pels paràmetres  $K_0$  i  $b$  del model matemàtic (eq. 5), i
- 3) el temps de pèrdua mitjana d'electròlits ( $t_{50}$ ).

Per cada un dels experiments es va realitzar l'anàlisi de la variància (ANOVA) i la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ) pels diferents paràmetres determinats. Prèviament es va avaluar l'homogeneïtat de les variàncies (prova de Bartlett) i la distribució normal dels residus (prova de Shapiro-Wilk).

Els tractaments estadístics es van realitzar amb el paquet d'aplicacions estadístiques JMP per Macintosh (JMP 2.0, SAS Institute Inc.).

## 5. Efecte dels fosfonats en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera

Es van realitzar experiments per determinar l'efecte dels fosfonats en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera. Es va determinar l'efecte de l'aplicació d'un sol producte a diferents concentracions (fosetil-Al, fosfonat potàssic) i es va comparar l'efecte de diferents fosfonats (fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina) aplicats a la mateixa dosi o a diferents dosis i cadències. El material vegetal utilitzat va dependre de l'experiment (branques de perera forçades a floració en condicions controlades, plantes mantingudes en hivernacle i arbres de diferents varietats en el camp). Es van utilitzar dues tècniques d'inoculació del patogen (en fulles separades de la planta i en fulles sobre la planta sencera). A la Taula 2.4 s'indiquen els productes, material vegetal i tècniques d'inoculació utilitzats en els experiments.

**Taula 2.4.** Experiments realitzats per determinar l'activitat de diversos fosfonats en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera

Material vegetal	Tractaments amb fosfonats	Forma d'inoculació del patogen
Branques de perera procedents de plantacions comercials, forçades a floració en condicions controlades	Fosetil-Al a diferents dosis (1) <sup>a</sup>	Inoculació sobre una ferida realitzada en les fulles separades de les branques
Plantes de perera de la varietat Conference mantingudes en hivernacle	Diferents fosfonats a la mateixa dosi (2)	Inoculació sobre una ferida realitzada en les fulles separades de les plantes
	Fosetil-Al (3) i fosfonat potàssic (4) a diferents dosis	
	Diferents fosfonats aplicats a varies dosis (5) Diferents fosfonats amb varies cadències d'aplicació (6)	Inoculació de totes les fulles en la planta sencera per microinfiltració localitzada
Arbres de diferents varietats de perera en plantacions	Aplicació de fosetil-Al (7)	Inoculació sobre ferida en les fulles separades dels arbres

<sup>a</sup> Cada valor indicat entre parèntesi correspon a un experiment

## 5.1. Material vegetal

El material vegetal utilitzat va ser diferent segons l'experiment (Taules 2.4 i 2.5). Es va avaluar l'efecte del tractament amb fosfonats en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles de branques de perera recollides de camp i forçades a floració en condicions controlades, en la planta sencera o en fulles separades de plantes de perera que havien estat mantingudes en hivernacle, i en arbres de diferents varietats de perera.

### *Branques de perera*

Es van utilitzar branques de perera de la varietat Grand Champion procedents de finques comercials de les comarques de Girona en les que no s'havien realitzat els tractaments convencionals amb fosetil-Al pel control de la necrosi de borrons de flor. Les branques es van recollir a finals d'hivern, quan els borrons florals estaven inflats (estadi B), de manera que posades en les condicions òptimes florissin en poc temps i de forma homogènia. Les branques es van mantenir a 4 °C i fosc, dins bosses de plàstic humitejades, fins al moment de provocar la floració. L'experiment es va repetir dues vegades (anys 1994 i 1995).

Per forçar les branques a floració es va utilitzar el mètode descrit per Montesinos i Vilardell (1991a) modificat a partir de Szkolnik i Hickey (1986). Les branques es van netejar amb aigua corrent, es van tallar per la base fins trobar teixit no obturat, i es van introduir en recipients amb una solució de sacarosa al 1%. A cada recipient amb la solució de sacarosa s'hi van posar 10 branques. Els recipients amb les branques es van posar a floració en una cambra d'ambient controlat (model PGR15, Conviron, Winnipeg, Manitoba, Canadà) a 22 °C, fotoperíode de 16 hores llum i humitat relativa del 80%, durant 4 setmanes. Cada setmana es van renovar les solucions, es van netejar les branques per la base i es va tallar el teixit contaminat i obturat pel creixement de llevats o de fongs. Les inoculacions es van realitzar a les 4 setmanes, quan les branques estaven en plena floració.

### *Plantes de perera mantingudes en hivernacle*

Es van utilitzar plantes de perera de la varietat Conference autoarrelades i clonades (clon CAV) obtingudes per micropropagació (Agromillora Catalana, S.A., Barcelona) de

les mateixes característiques que les utilitzades en els experiments anteriors. Les plantes es van forçar a brotar 2 mesos abans de les inoculacions i, com en experiments anteriors (apartat 1.1 pàg. 139), el primer mes es van fertilitzar setmanalment amb una solució de 200 ppm de N-P-K (20-10-20). El mes anterior a l'inici de l'experiment només es va aportar N-K (20-20), per evitar la interferència del fosfat amb els fosfonats utilitzats en els tractaments experimentals.

#### *Arbres de diferents varietats de perera*

Es va avaluar l'efecte del tractament amb fosetil-Al aplicat a camp en arbres de diferents varietats de perera de la col·lecció de varietats de l'Estació Experimental Agrícola de la Fundació Mas Badia. Es van utilitzar les varietats Alexandrine, Beurre Anjou, Beurre Hardent Point, Blanquilla, Conference, Doyenne du Comice, General Leclerc, Magness, Maxine, Passe Crassane, Williams i Winter Nellis. Aquestes varietats diferien en la sensibilitat al patogen (veure Taula 1.33).

Els arbres tenien les mateixes característiques que els utilitzats en la determinació de la sensibilitat de diferents varietats de perera a *P. syringae* pv. *syringae* (apartat 2.1 pàg. 32). L'experiment es va realitzar durant el mes de maig de 1994, període en que els arbres estaven brotant i es podien utilitzar fulles joves per realitzar les inoculacions del patogen.

### **5.2. Tractaments amb fosfonats**

Es van realitzar diferents experiments per avaluar l'efecte del producte, de la dosi i de la cadència d'aplicació en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera. A la Taula 2.5 s'indiquen els tractaments amb fosfonats realitzats i les concentracions i cadència d'aplicació de cada producte pels diferents experiments. A continuació es descriuen els tractaments realitzats en cada experiment.

En tots els experiments es van regar plantes amb aigua destil·lada, i aquestes es van utilitzar com a control no tractat amb fosfonats.

**Taula 2.5.** Tractaments realitzats per a l'avaluació de l'efecte dels fosfonats en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera

<i>Experiment</i> <sup>a</sup>	<i>Dosi d'aplicació</i> <sup>b</sup> (g HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> l <sup>-1</sup> )
<b>Efecte de la dosi de fosetil-Al</b>	
Branques forçades a floració (1)	0, 0.18, 0.93 i 1.86 (repetició 1) <sup>c</sup> 0, 0.18, 0.62 i 0.93 (rep. 2)
Plantes de perera en hivernacle (3)	0, 0.62, 0.93, 1.24, 1.86 i 2.79 (rep. 1) 0, 0.62, 0.93, 1.24, 1.86, 2.79, 3.72, 4.34 i 6.20 (rep. 2)
<b>Efecte de la dosi de fosfonat potàssic</b>	
Plantes de perera en hivernacle (4)	0, 0.93 i 1.86 (rep. 1 i 2)
<b>Efecte de diferents fosfonats a dosi fixa</b> (fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina)	
Plantes de perera en hivernacle (2)	1.86 (rep. 1 i 2)
<b>Efecte de la dosi de diferents fosfonats</b> (fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina)	
Plantes de perera en hivernacle (5)	0, 0.62, 1.86, 3.72 i 6.20 (rep. 1 i 2)
<b>Efecte de la cadència d'aplicació de fosfonats</b> (fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon)	
Plantes de perera en hivernacle (6)	1.86 aplicat durant 0, 3, 6 i 9 dies
<b>Efecte del fosetil-Al a camp</b>	
Arbres de diferents varietats de perera (7)	1.86 (rep. 1 i 2)

<sup>a</sup> Experiments realitzats per avaluar l'efecte del tractament amb fosfonats en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera. Entre parèntesi s'indica la referència de l'experiment (veure Taula 2.4)

<sup>b</sup> Dosis d'aplicació de cada fosfonat en els diferents experiments. La forma d'aplicació dels productes i la cadència s'expliquen en el text

<sup>c</sup> Entre parèntesi s'indiquen les repeticions de l'experiment. Si no hi ha indicació, l'experiment es va realitzar una sola vegada



### *Efecte de la dosi de fosetil-Al*

L'efecte de la dosi de fosetil-Al en la infecció de *P. syringae pv. syringae* en perera es va determinar en dos tipus de material vegetal diferent: branques forçades a floració en condicions controlades i plantes de perera en contenidor mantingudes en hivernacle.

En les branques forçades a floració en condicions controlades els tractaments amb fosetil-Al es van realitzar afegint el producte a la solució nutritiva en que es van posar les branques a la floració. Es va afegir fosetil-Al de manera que les concentracions finals de fosetil-Al fossin les descrites a la Taula 2.5. A cada recipient amb la solució de sacarosa i fosetil-Al s'hi van posar 10 branques. Cada tractament va constar de tres repeticions (3 recipients amb 10 branques per recipient). L'experiment es va repetir dues vegades (anys 1994 i 1995). A la Taula 2.5 s'indiquen les dosis de fosetil-Al utilitzades en cada repetició de l'experiment.

En els tractaments en plantes de perera en contenidor, les plantes es van regar diàriament durant 5 dies amb 100 ml de solucions aquoses de fosetil-Al a diferents concentracions. L'experiment es va repetir dues vegades (anys 1994 i 1995). A la Taula 2.5 s'indiquen les dosis utilitzades en cada repetició de l'experiment. Les dosis utilitzades l'any 1995 van variar respecte les de l'any 1994 en funció dels resultats obtinguts en la primera repetició de l'experiment. En cada experiment es van regar 15 plantes amb cada dosi. Acabats els tractaments amb fosetil les plantes es van deixar dos dies sense regar i a continuació es van inocular amb el patogen.

### *Efecte de la dosi de fosfonat potàssic*

Els tractaments es van realitzar en plantes de perera en hivernacle. Les plantes es van regar diàriament durant 5 dies amb 100 ml diaris de solucions aquoses de fosfonat potàssic a diferents concentracions (Taula 2.5). L'experiment es va repetir dues vegades (anys 1994 i 1995). Es van regar 15 plantes amb cada dosi. En finalitzar els tractaments amb fosfonat, les plantes es van deixar dos dies sense regar abans de ser inoculades amb el patogen.

### *Efecte de diferents fosfonats aplicats a la mateixa dosi*

Es va determinar l'efecte del fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina, aplicats a la mateixa dosi, en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en plantes de perera.

Les plantes es van regar diàriament durant 5 dies amb 100 ml de solucions de cada fosfonat preparades en aigua destil·lada a una concentració d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  l<sup>-1</sup>. Les plantes es van deixar dos dies sense regar al final del tractament (per assegurar l'absorció total dels productes) i posteriorment es van inocular amb el patogen. Mentre es van realitzar els tractaments amb els fosfonats les plantes es van mantenir en hivernacle. La quantitat total de fosfonat aplicada per planta pels diferents productes va ser de 0.93 g  $\text{HPO}_3^{2-}$ . Per conèixer la quantitat d'ingredient actiu aplicada per producte (g i.a. l<sup>-1</sup> o g i.a. per planta) cal multiplicar les dosis pels factors de conversió corresponents (veure apartat 1.1 pàg. 139). Es van utilitzar 30 plantes per cada producte i l'experiment es va repetir dues vegades (anys 1994 i 1995).

### *Efecte de la dosi de diferents fosfonats*

Es van regar plantes de perera diàriament durant 5 dies amb 100 ml de solucions, preparades en aigua destil·lada, de fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina a les concentracions indicades a la Taula 2.5. La quantitat total de fosfonat aplicada per planta al final del tractament van ser de 0.31, 0.93, 1.36 i 3.10 g  $\text{HPO}_3^{2-}$ , respectivament per cada dosi. Per conèixer la quantitat d'ingredient actiu (g i.a. l<sup>-1</sup> o g i.a. per planta) aplicada per producte cal multiplicar les dosis pels factors de conversió indicats a l'apartat 1.1 (pàg. 139). Per cada producte i dosi es van utilitzar tres repeticions de tres plantes. L'experiment es va repetir dues vegades.

### *Efecte de la cadència d'aplicació de diferents fosfonats*

Es van regar plantes de perera diàriament amb 100 ml de solucions aquoses de fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina a la dosi d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  l<sup>-1</sup> durant 3, 6 i 9 dies. La dosi total de fosfonat aplicada per planta va ser de 0.56, 1.12 i 1.67 g  $\text{HPO}_3^{2-}$ , respectivament. Per cada producte i cadència de tractament es van utilitzar tres repeticions de tres plantes.

### *Efecte del fosetil-Al en arbres de diferents varietats de perera*

Els tractaments amb fosetil-Al es van realitzar simultàniament per polvorització foliar i per via radicular. En cada un dels arbres de les diferents varietats es van realitzar tres aplicacions de fosetil-Al per polvorització i dues regant. Les aplicacions per via radicular es van realitzar amb cadència setmanal durant els quinze dies anteriors a les inoculacions, i les aplicacions per via foliar es van realitzar els mateixos dies en que es van regar amb fosetil-Al i addicionalment es va realitzar una tercera aplicació el dia anterior a les inoculacions. En cada un dels tractaments per irrigació es van aplicar 3 l per arbre de solucions de fosetil-Al d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  l<sup>-1</sup>. Per polvorització es va aplicar 1 l per arbre de solucions de fosetil-Al de la mateixa dosi. Per cada una de les varietats es van tractar 5 arbres i uns altres 5 es van deixar sense tractar (control).

### **5.3. Determinació del pH del substrat en les plantes regades amb fosfonats**

El pH del substrat de les plantes tractades amb diferents fosfonats a la mateixa dosi (experiment 2) es va mesurar després dels tractaments amb els fosfonats, el mateix dia en que es van realitzar les inoculacions amb el patogen. Per a la determinació del pH del substrat es van agafar mostres de cada tractament (5 g de substrat per planta). Posteriorment es van homogeneïtzar en  $\text{H}_2\text{O}$  destil·lada o en KCl 0.1M, en proporció 1:2.5 durant 30 minuts amb agitació (Wild, 1973). Es van fer lectures del pH dels extractes de cada mostra (fase líquida) just després de l'agitació i al cap de 4 hores. Per cada tractament i repetició es van fer dues determinacions de pH. La lectura del pH es va realitzar a 20 °C amb un pH-metre (micropH 2001, Crison Instruments, Barcelona).

### **5.4. Inòcul**

Es van utilitzar les soques EPS94 i EPS17a de *P. syringae* pv. *syringae*. Es van preparar suspensions en aigua destil·lada estèril d' $1-5 \times 10^7$  o  $1-5 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> (segons el tipus d'inoculació realitzada) a partir de cultius purs crescuts en agar B de King (King i col., 1954) incubats durant 24 h a 25 °C. Les suspensions es van preparar el mateix dia de les inoculacions i es van mantenir a 4°C. Per conèixer la concentració inoculada es van sembrar en agar B de King les dilucions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  i  $10^{-7}$  de les suspensions bacterianes i es va fer el recompte a les 48 h de la d'incubació a 25 °C.

En la determinació de l'efecte dels fosfonats aplicats a la mateixa dosi i de l'efecte del fosetil-Al en arbres de diferents varietats de perera, es van inocular les dues soques de *P. syringae* pv. *syringae*. En la resta d'experiments es va inocular només *P. syringae* pv. *syringae* EPS94.

### 5.5. Inoculacions i incubació del material vegetal inoculat

Es van utilitzar dues tècniques d'inoculació en funció del material vegetal i la resposta que es volia observar (Taula 2.4). Es van realitzar inoculacions en fulles separades de la planta seguint la tècnica descrita per Yessad i col.(1992), utilitzada en el capítol anterior en l'avaluació de la patogènia de *P. syringae* pv. *syringae* i la sensibilitat de varietats de perera. També es van realitzar inoculacions en planta sencera per microinfiltració localitzada en les fulles amb la tècnica desenvolupada en el capítol anterior (pàg. 42). Aquesta tècnica, com s'ha vist anteriorment, permet estudiar la resposta de la planta a la infecció del patogen.

Es van inocular les fulles separades de la planta en els experiments en branques portades a floració, en arbres de diferents varietats i en alguns dels realitzats en plantes mantingudes en hivernacle (determinació de l'efecte de la dosi de fosetil-Al, de la dosi de fosfonat potàssic i de diferents fosfonats aplicats a la mateixa dosi).

En l'avaluació de l'efecte de la dosi i de la cadència d'aplicació de diversos fosfonats en la infecció del patogen en plantes de perera es van realitzar inoculacions en la planta sencera.

#### *Inoculacions en fulles separades de la planta*

Les inoculacions es van realitzar sobre les fulles més joves, i per tant més sensibles, dels brots en creixement actiu dels arbres, de les plantes i en les fulles basals dels corimbes florals de les branques forçades a floració. En tots els experiments les fulles es van desinfectar i inocular seguint el procediment descrit en l'apartat 2.3 (pàg. 35) (Figura 1.1). En cada fulla es van inocular 20 µl de suspensions d' $1-5 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> del patogen sobre la ferida. Com a control, en cada experiment es van inocular fulles dels diferents tractaments amb aigua destil·lada estèril.

Les fulles inoculades es van col·locar en plaques Petri que es van precintar amb Parafilm, i es van incubar durant 48 hores en una cambra d'ambient controlat (model PGR15, Conviron, Winnipeg, Manitoba, Canadà). Les condicions d'incubació van ser 25 °C, 16 hores llum i 18 °C, 8 hores fosc, i humitat relativa superior al 90%.

#### *Inoculacions en la planta sencera*

Es van inocular totes les fulles de cada planta per microinfiltració localitzada de 50 µl de suspensions d' $1-5 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 tal com s'ha descrit a la pàgina 42 (Figura 1.3). En cada fulla es van realitzar 6 inoculacions (tres a cada costat del nervi principal). Com a control es van inocular plantes dels diferents tractaments amb aigua destil·lada estèril.

Les plantes inoculades es van incubar durant 5 dies en una cambra d'ambient controlat (model PGR15, Conviron, Winnipeg, Manitoba, Canadà) a 25°C, 16 hores llum i 18 °C, 8 hores fosc, i humitat relativa del 70-80%. Durant el període d'incubació les plantes es van regar amb aigua destil·lada, per no aportar fosfats addicionals que poguessin interferir amb els tractaments realitzats.

### **5.6. Disseny experimental**

El material vegetal utilitzat en un mateix experiment era homogeni, però diferia entre experiments. En tots els experiments el material vegetal de les diferents repeticions i tractaments es va col·locar a l'atzar en l'hivernacle o en la cambra de floració, a fi de realitzar els tractaments amb fosfonats. El material inoculat també es va col·locar de forma aleatòria en la cambra d'ambient controlat.

#### *Efecte de la dosi de fosetil-Al en branques*

Es va realitzar un disseny experimental totalment a l'atzar amb un sol factor (dosi de fosetil-Al) amb tres repeticions de 9 o 12 fulles per tractament en la primera o segona repetició de l'experiment, respectivament.

#### *Efecte de la dosi de fosetil-Al en plantes*

Disseny experimental totalment a l'atzar amb un sol factor (dosi de fosetil-Al), tres repeticions de 9 fulles per tractament i dues repeticions de l'experiment.

*Efecte de la dosi de fosfonat potàssic en plantes*

Disseny experimental totalment a l'atzar amb un sol factor (dosi de fosfonat) i tres repeticions de 9 fulles per tractament. L'experiment es va repetir dues vegades.

*Efecte de diferents fosfonats aplicats a la mateixa dosi*

Disseny experimental factorial totalment a l'atzar amb dos factors (producte i soca de patogen) i tres repeticions de 3 fulles per tractament. L'experiment es va repetir dues vegades.

*Efecte de la dosi d'aplicació de diferents fosfonats*

Disseny experimental factorial totalment a l'atzar amb dos factors (producte i dosi), tres repeticions de tres plantes per tractament i dues repeticions de l'experiment.

*Efecte de la cadència d'aplicació de diferents fosfonats*

Disseny experimental factorial totalment a l'atzar amb dos factors (producte i cadència) i tres repeticions de tres plantes per tractament.

*Efecte del fosetil-Al aplicat en arbres*

Es va realitzar un disseny factorial totalment aleatoritzat amb tres factors (tractament amb fosetil-Al, varietat de perera i soca de patogen) i tres repeticions de tres fulles per tractament.

## **5.7. Avaluació de la severitat de la infecció**

La presència d'infeccions i la severitat es van avaluar a les 48 hores de la incubació, per les inoculacions en fulles separades i als 5 dies per les inoculacions en la planta sencera.

Per mesurar la intensitat de les infeccions en les inoculacions en la planta sencera es van utilitzar els índexs de severitat (*Is*) descrits a la Taula 1.5.

En les inoculacions en fulles separades de la planta la severitat de la infecció es va avaluar amb els índexs de severitat (*Is*) descrits a la Taula 2.6.

**Taula 2.6.** Índexs de severitat utilitzats per avaluar la intensitat de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles de perera separades de la planta

<i>Índex de severitat</i>	<i>Síntomes</i>
0	Absència de símptomes
1	Necrosi localitzada al punt d'inoculació
2	Necrosi del nervi principal de la fulla
3	Necrosi del nervi principal, secundaris i/o de la superfície foliar

A partir dels índexs de severitat ( $I_s$ ) de cada lesió es va calcular la severitat de la infecció per fulla o la severitat de la malaltia per planta en cada repetició dels diferents tractaments. Es va seguir el mateix conveni establert en el capítol anterior per diferenciar entre *severitat de la infecció* en fer referència a la severitat en un òrgan de la planta (en el nostre cas fulla) i *severitat de la malaltia* en fer referència a la severitat en la planta sencera. En les inoculacions en fulles separades de la planta es va calcular la severitat de la infecció per fulla ( $S_f$ ) amb la següent fórmula:

$$S_f = \frac{\sum_{i=1}^n I_s i}{n \times 3} \times 100$$

on:  $S_f$ : Severitat de la infecció per fulla  
 $I_s$ : Índex de severitat de la infecció per cada fulla ( $i$ )  
 $n$ : Nombre de fulles per repetició en un tractament  
 3: Valor màxim de l'índex de severitat

En les inoculacions en la planta sencera es va utilitzar la fórmula descrita a la pàgina 44 per calcular la severitat de la malaltia per planta ( $S_p$ ) a partir dels índexs de severitat de totes les fulles de la planta o d'un grup de fulles de la planta (fulles joves i fulles velles).

## 5.8. Anàlisi estadística

En la determinació de l'efecte del tractament d'arbres de diferents varietats de perera amb fosestil-Al en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* es van realitzar les mateixes anàlisis estadístiques que en la determinació de la sensibilitat de diferents

varietats de perera al patogen (capítol 1, apartat 2.6, pàg. 39). Es va calcular la freqüència de cada un dels índexs de severitat en els tractaments de l'experiment. A partir d'aquestes freqüències es va obtenir un model loglineal per predir la freqüència de l'índex de severitat en funció de l'aplicació de fosetil-Al, la varietat de perera i la soca de patogen, mitjançant el mètode de modelització de dades categòriques de màxima versemblança. La bondat d'ajust del model obtingut es va avaluar mitjançant la prova de  $\chi^2$  per la relació de versemblança. L'efecte dels diferents factors en el model es va determinar mitjançant la prova de  $\chi^2$  de la versemblança per cada factor.

En la resta d'experiments es va determinar l'efecte dels diferents factors i les interaccions entre ells en la severitat de la infecció o de la malaltia mitjançant una anàlisi de la variància (ANOVA) o de la covariància (ANCOVA) utilitzant la mitjana dels valors de severitat de les repeticions de cada tractament. En els experiments en que algun dels factors era quantitatiu (dosi de producte, pH, dies d'aplicació) aquests factors es van considerar com a covariables en el model. Per un mateix experiment l'efecte dels factors o nivells d'un factor en la severitat de la malaltia es va comparar amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ).

L'homogeneïtat de les variàncies dels valors de severitat de tots els tractaments es va determinar amb la prova de Bartlett, i la distribució normal dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk.

La relació entre la concentració de fosfonats i la severitat de la malaltia, es va obtenir per regressió lineal simple considerant la dosi de fosfonat (transformada en  $\text{Log}_{10}$ ) com a variable independent i la severitat de la malaltia per fulla ( $S_f$ ) o per planta ( $S_p$ ) (o les transformacions en Probit ( $S_f/100$ ) o Probit ( $S_p/100$ )) com a variable dependent. Les rectes de regressió obtingudes es van avaluar mitjançant el coeficient de determinació ( $R^2$ ) i el grau de significació ( $P>F$ ). En el cas que les equacions presentessin un bon ajust es van estimar les dosis efectives de fosfonats per a la reducció de la severitat de la malaltia en un 50% ( $DE_{50}$ ) o en un 90% ( $DE_{90}$ ) respecte els controls no tractats.

Els tractaments estadístics es van realitzar amb el paquet d'aplicacions estadístiques JMP per Macintosh (JMP 2.0, SAS Institute Inc.).



## 6. Activitat antibacteriana *in vitro* dels fosfonats

### 6.1. Inhibició del creixement bacterià per la incorporació de fosfonats en medi sòlid

Es va determinar l'efecte del fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon, fosfomicina i estreptomycina (antibiòtic de referència) en la inhibició del creixement de 26 soques de les espècies: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Erwinia amylovora*, *E. herbicola*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. syringae* pv. *maculicola*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. viridiflava*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. arboricola* pv. *corylina*, i *X. arboricola* pv. *juglandis* (Taula 2.7).

#### 6.1.1. Obtenció de cultius purs dels bacteris en medi sòlid

Les soques es trobaven en forma de liofilitzat o en tubs amb agar inclinat. Els liofilitzats es van resuspendre en brou B de King (King i col., 1954) i es van incubar a 25°C durant 12 h. A continuació les soques es van sembrar en plaques amb agar YDC (Schaad, 1988) per les espècies de *Xanthomonas* i amb agar B de King (King i col., 1954) per la resta de bacteris i es van fer créixer durant 3 dies a 25 °C.

#### 6.1.2. Incorporació dels productes en el medi de creixement

Per a l'avaluació de la inhibició del creixement bacterià es va utilitzar el medi CYE (Andersen i col., 1991). Aquest medi presenta baixa capacitat de complexació de metalls i altres productes. No conté fosfats afegits i està compost per 1.7 g de casitona, 0.35 g d'extracte de llevat, 2 g de glicerol i 15 g d'agar en 1 l d'aigua destil·lada.

Es van preparar solucions dels fosfonats i d'estreptomycina en aigua destil·lada estèril a diferents concentracions de manera que, afegint 1 ml de cada solució de fosfonat a 19 ml de medi CYE, s'assolissin les concentracions de 634, 317, 158, 79, 39, 19, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 i 0 µg  $\text{HPO}_3^{2-}$  ml<sup>-1</sup> pels diferents fosfonats, i 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 i 0 µg i.a. ml<sup>-1</sup> per l'estreptomycina.

**Taula 2.7.** Procedència de les soques bacterianes utilitzades en l'avaluació de la capacitat inhibidòria del creixement bacterià *in vitro* per diferents fosfonats

Bacteri	Hoste	Origen <sup>a</sup>
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> 1379	<i>Phaseolus vulgaris</i>	CFBP
<i>Erwinia amylovora</i> 6076	<i>Pyrus communis</i>	PMV
<i>E. amylovora</i> 1376	<i>Cotoneaster</i> sp.	CFBP
<i>E. amylovora</i> 1430	<i>Crataegus</i> sp.	CFBP
<i>E. herbicola</i> EPS494	<i>Pyrus communis</i>	INTEA-EPS
<i>Pseudomonas fluorescens</i> EPS288	<i>Zea mays</i>	INTEA-EPS
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> 1637	<i>Raphanus sativus</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> 1738	<i>Brassica oleracea</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	<i>Phaseolus vulgaris</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS16	<i>Pyrus communis</i>	INTEA-EPS
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS17a	<i>Pyrus communis</i>	INTEA-EPS
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94	<i>Pyrus communis</i>	INTEA-EPS
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPSMV2	<i>Pyrus communis</i>	INTEA-EPS
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPSMV4	<i>Pyrus communis</i>	INTEA-EPS
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPSLL3Y	<i>Pyrus communis</i>	INTEA-EPS
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37 (3077) <sup>b</sup>	<i>Pyrus communis</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 1392	<i>Syringa vulgaris</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> S8	<i>Pyrus communis</i>	OSU
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 1426	<i>Lycopersicon esculentum</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 1427	<i>Lycopersicon esculentum</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 1916	<i>Lycopersicon esculentum</i>	CFBP
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 2212	<i>Lycopersicon esculentum</i>	CFBP
<i>P. viridiflava</i> 2107	<i>Phaseolus</i> sp.	CFBP
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 2565	<i>Corylus avellana</i>	CFBP
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 1317.3	<i>Juglans regia</i>	IVIA
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1119	<i>Brassica oleracea</i>	CFBP

<sup>a</sup> CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA Angers (France)  
 IVIA: M.M. López, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia  
 OSU: D. Gross, Oregon State University, USA  
 PMV: Laboratoire de Pathologie Moléculaire et Végétale INRA/INA-PG, Paris (France)  
 INTEA-EPS: Institut de Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona

<sup>b</sup> entre parèntesi s'indica la nova referència de la CFBP (any 1997)

Es va afegir 1 ml de les solucions de cada producte i concentració a tubs amb 19 ml d'agar CYE a 50 °C i es va distribuir en plaques Petri. Les soques bacterianes es van sembrar passant un escuradents estèril per les colònies dels cultius purs de cada soca i repicant-les en la superfície del medi CYE amb els productes. Totes les soques es van sembrar en cada placa. Per cada producte i concentració es van fer tres repeticions. Com a control es van sembrar les mateixes soques en plaques de medi CYE sense productes (substituint el producte per aigua destil·lada). Els bacteris sembrats en les plaques es van fer créixer a 25 °C. L'experiment es va repetir dues vegades.

### **6.1.3. Avaluació de l'activitat inhibidora del creixement bacterià pels fosfonats**

Als 5 dies de la incubació dels cultius es va avaluar el creixement dels diferents bacteris. La presència de colònies dels bacteris es va considerar com a tolerància del bacteri al producte i dosi corresponents.

### **6.1.4. Disseny experimental**

Es va realitzar un disseny factorial totalment aleatoritzat amb tres factors (soca bacteriana, producte i concentració de producte), tres repeticions per tractament i dues repeticions de l'experiment.

### **6.1.5. Determinació del contingut en fosfats del medi CYE**

El contingut en fosfats del medi CYE es va determinar seguint el mètode de Cottenie i col. (1979). Es van pesar 2 g de medi CYE i es van deshidratar en una estufa de dessecació durant 48 hores a 60-70 °C. A continuació la mostra es va calcinar a 450 °C durant 4 hores, es va deixar refredar i es va fer una digestió àcida a 90 °C durant 30 minuts afegint 3 ml d'àcid clorhídric 35% i 3 ml d'àcid nítric 35%. Una vegada digerida es van agafar alíquotes d'1 ml i s'hi van afegir 2 ml de nitrovanadomolibdat (preparat amb 25 ml de molibdat amònic 5%, 25 ml de vanadat amònic 25% i 25 ml àcid nítric 1/3), i 7 ml d'aigua destil·lada. Es va deixar 1 hora a temperatura ambient (20 °C) i es va llegir l'absorbància a 430 nm. Es van preparar solucions patró en aigua destil·lada amb 0, 5, 10, 15 i 20  $\mu\text{g KH}_2\text{PO}_4 \text{ ml}^{-1}$  de les que també es va llegir l'absorbància a 430 nm.

### 6.1.6. Determinació del pH del medi CYE amb fosfonats afegits

El pH del medi CYE es va determinar amb addició de fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina a les concentracions 0, 0.03, 0.06, 0.15, 0.31, 0.62, 1.86, 3.72 i 6.20 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{l}^{-1}$ . Es van barrejar tots els components del medi, s'hi van afegir els fosfonats a les diferents concentracions i es va homogeneïtzar. A continuació es va mesurar el pH amb un pH-metre (microPH 2001, Crison Instruments, Barcelona) a 20 °C. Per cada producte i concentració es van fer 6 repeticions.

## 6.2. Supervivència de *P. syringae* pv. *syringae* en solucions aquoses de fosfonats

### 6.2.1. Solucions de fosfonats

Es van preparar solucions en aigua destil·lada estèril de fosetil-Al i fosfonat potàssic a les concentracions de 0, 0.16, 0.31, 0.62 i 1.24 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{l}^{-1}$ . Per cada producte i concentració es van preparar 6 tubs amb 9 ml de solució.

### 6.2.2. Suspensions bacterianes en solucions de fosfonats

Les suspensions de les soques EPS17a i EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* es van preparar a partir de cultius purs crescuts a 25 °C durant 24 hores en agar B de King (King i col., 1954). Les suspensions es van preparar resuspenent les colònies en aigua destil·lada estèril i es va ajustar la concentració a  $1-5 \times 10^9$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ .

Es va afegir 1 ml de les suspensions bacterianes a 9 ml de la solució amb fosfonats a diferents concentracions a fi d'obtenir concentracions finals de les suspensions bacterianes en les solucions amb fosfonats d' $1-5 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ . Per cada soca, producte i concentració es van preparar 3 tubs. Les suspensions bacterianes es van fer créixer a 25 °C durant 2 hores. Es va preparar un control afegint 1 ml d'aigua destil·lada estèril, en lloc dels bacteris, en els tubs amb les diferents dosis de fosfonats i es va col·locar a les mateixes condicions.

### **6.2.3. Avaluació de la supervivència de les suspensions bacterianes en les solucions amb fosfonats**

Es van agafar alíquotes de les suspensions bacterianes (1 ml de mostra per tractament i repetició) a diferents temps d'incubació (0, 30 i 60 minuts). Es van sembrar 50 µl de les dilucions 1:10 corresponents ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$ ) en plaques Petri amb agar B de King (King i col., 1954) i es van col·locar a 25 °C. A les 48 hores es va realitzar el recompte del nombre de colònies formades per cada soca de *P. syringae* pv. *syringae* i es va determinar la concentració (ufc ml<sup>-1</sup>) de les suspensions dels bacteris en les solucions del fosfonat en cada temps. Per cada repetició del tractament es van fer dos recomptes.

### **6.2.4. Determinació del pH de solucions de fosfonats a diferents concentracions**

Es va determinar el pH de solucions en aigua destil·lada de fosetil-Al i fosfonat potàssic a les concentracions 0.06, 0.15, 0.31, 0.62, 1.86, 3.72 i 6.2 gHPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>. Addicionalment es va determinar el pH de solucions aquoses de fosfomicina i etefon a les mateixes concentracions. Per cada producte i concentració es van fer 6 repeticions. La mesura del pH es va realitzar amb un pH-metre (micropH 2001, Crison Instruments, Barcelona) a 20 °C.

### **6.2.5. Disseny experimental i anàlisi estadística**

Es va realitzar un disseny factorial totalment aleatoritzat amb 3 factors (soca bacteriana, producte i concentració). Cada tractament va constar de tres repeticions.

L'efecte del fosfonat i la dosi o del pH de les solucions, en la supervivència dels bacteris es va determinar mitjançant una anàlisi de la covariància (ANCOVA) amb la mitjana del nombre de bacteris viables (transformats en Log<sub>10</sub>) de les tres repeticions dels diferents tractaments. La concentració dels fosfonats i el pH, en ser variables quantitatives es van considerar com a covariables. L'homogeneïtat de les variàncies i la distribució normal dels residus es van avaluar amb la prova de Bartlett i la prova de Shapiro-Wilk, respectivament. Tots els tractament estadístics es van realitzar amb el paquet d'aplicacions estadístiques JMP per Macintosh (JMP 2.0, SAS Institute Inc.).

## RESULTATS

### 1. Virulència de *P. syringae* pv. *syringae* en plantes de perera tractades amb fosfonats

#### 1.1. Efecte del fosetil-Al

Les variàncies de la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference, tractades amb fosetil-Al i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a diferents concentracions, es van mostrar homogènies segons la prova de Bartlett (( $P>F$ )=0.134) i els residus van presentar una distribució normal ( $W=0.92$ , ( $P<W$ )=0.144) segons la prova de Shapiro-Wilk. L'anàlisi de la covariància va indicar un efecte molt significatiu de la dosi de patogen (( $P>F$ )<0.001) i significatiu de l'aplicació de fosetil-Al i de la interacció dosi de patogen-aplicació de fosetil-Al, en la severitat de la malaltia (Taula 2.8). Tant en les plantes tractades amb fosetil-Al com en les no tractades, un augment en la dosi de patogen va produir un augment en la severitat de la malaltia (Figura 2.3). Els nivells més elevats de malaltia es van obtenir a la dosi màxima inoculada ( $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>), tant en plantes tractades amb fosetil-Al com en les no tractades. A la dosi de patogen d' $1 \times 10^6$  ufc ml<sup>-1</sup> es van obtenir nivells baixos de severitat de la malaltia (25-30 %) i similars en els dos tractaments. A dosis de patogen superiors les plantes tractades amb fosetil-Al van mostrar una reducció en la severitat de la malaltia respecte les no tractades. En les plantes inoculades amb aigua estèril no es van observar símptomes d'infecció.

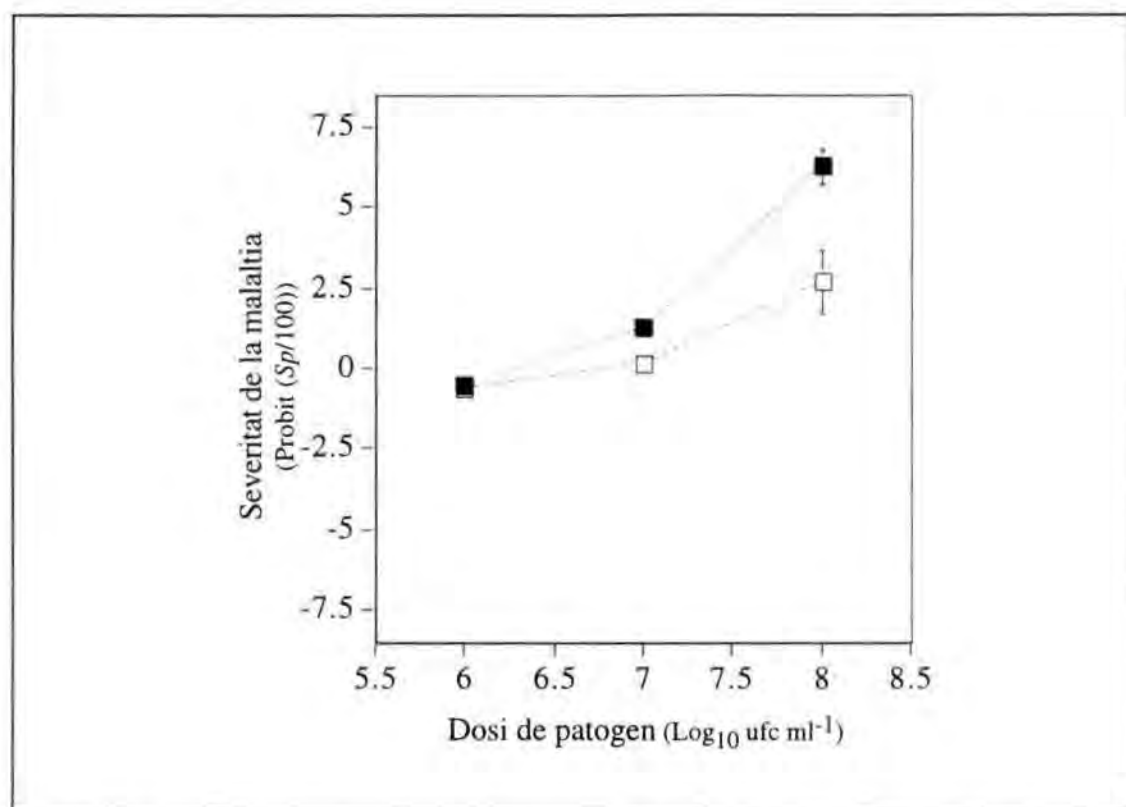
**Taula 2.8.** Efecte del tractament amb fosetil-Al i de la dosi de *P. syringae* pv. *syringae* en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
Dosi patogen <sup>a</sup>	1	75.77	52.57	0.0000
Aplicació fosetil-Al <sup>b</sup>	1	6.91	4.79	0.0460
Dosi x aplicació	1	9.21	6.39	0.0241
Error	14	20.18		

Anàlisi de la covariància realitzada amb la mitjana dels valors de severitat (*Sp*) transformats en Probit (*Sp/100*) de 3 repeticions de 3 plantes per tractament

<sup>a</sup> Es va inocular *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a les concentracions  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> en totes les fulles de cada planta

<sup>b</sup> Les plantes es van regar diàriament durant 5 dies amb 100 ml de fosetil-Al a la dosi d' $1.86 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  o amb aigua (control no tractat)



**Figura 2.3.** Relació dosi-resposta entre la severitat de la malaltia ( $Sp$ ) i la dosi de patògen en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fasetil-Al (blanc) o no tractades (negre) inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Els valors corresponen a la mitjana de tres repeticions. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana ( $P=0.05$ ).

A partir dels valors de severitat de la malaltia de les repeticions de cada tractament es van obtenir, per regressió lineal simple, les equacions que relacionen la severitat de la malaltia (Probit ( $Sp/100$ )) amb la dosi de patògen ( $\text{Log}_{10}$  dosi) (Taula 2.9). Es va comprovar la distribució normal dels residus dels valors de severitat de la malaltia (Probit ( $Sp/100$ )) pels dos tractaments. Tant en les plantes tractades amb fasetil-Al com en les plantes no tractades els residus es van distribuir de forma normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.89$ , ( $P < W$ )=0.169) i  $W=0.88$ , ( $P < W$ )=0.161, respectivament). En obtenir funcions lineals amb bon ajust, es van calcular les dosis de patògen necessàries per assolir una severitat del 50 % ( $DE_{50}$ : dosi infectiva mitjana) i del 90% ( $DE_{90}$ ) (Taula 2.9). La  $DE_{50}$  en les plantes tractades amb fasetil-Al ( $3.3 \times 10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ) va ser lleugerament superior que en les plantes no tractades ( $2.0 \times 10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ). La  $DE_{90}$  en les plantes tractades amb fasetil-Al ( $1.9 \times 10^7$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ) va ser aproximadament 10 vegades superior a la de les plantes no tractades ( $4.5 \times 10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ).

**Taula 2.9.** Dosis de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 necessàries per obtenir nivells de severitat de la malaltia del 50% i del 90% (DE<sub>50</sub> i DE<sub>90</sub>) en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosetil-Al

Tractament	Origen <sup>c</sup>	Pendent <sup>c</sup>	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>	Prob>F <sup>b</sup>	DE <sub>50</sub> <sup>c</sup> Log <sub>10</sub> (ufc ml <sup>-1</sup> )	DE <sub>90</sub> <sup>c</sup> Log <sub>10</sub> (ufc ml <sup>-1</sup> )
<i>Control no tractat</i>	-21.39 (3.49)	3.39 (0.49)	0.87	0.0002	6.31 (0.001)	6.65 (0.004)
<i>Fosetil-Al</i>	-10.70 (3.41)	1.64 (0.48)	0.62	0.0117	6.52 (0.002)	7.28 (0.009)

Funcions obtingudes per regressió lineal simple dels valors de severitat de la malaltia (*Sp*) transformats en Probit (*Sp*/100) i la dosi de patògen transformada en Log<sub>10</sub>. Es van utilitzar els valors de severitat de tres repeticions per tractament

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> de l'ajust dels valors predits pel model lineal respecte els observats

<sup>b</sup> Probabilitat del model lineal

<sup>c</sup> Entre parèntesi s'indica l'error estàndard

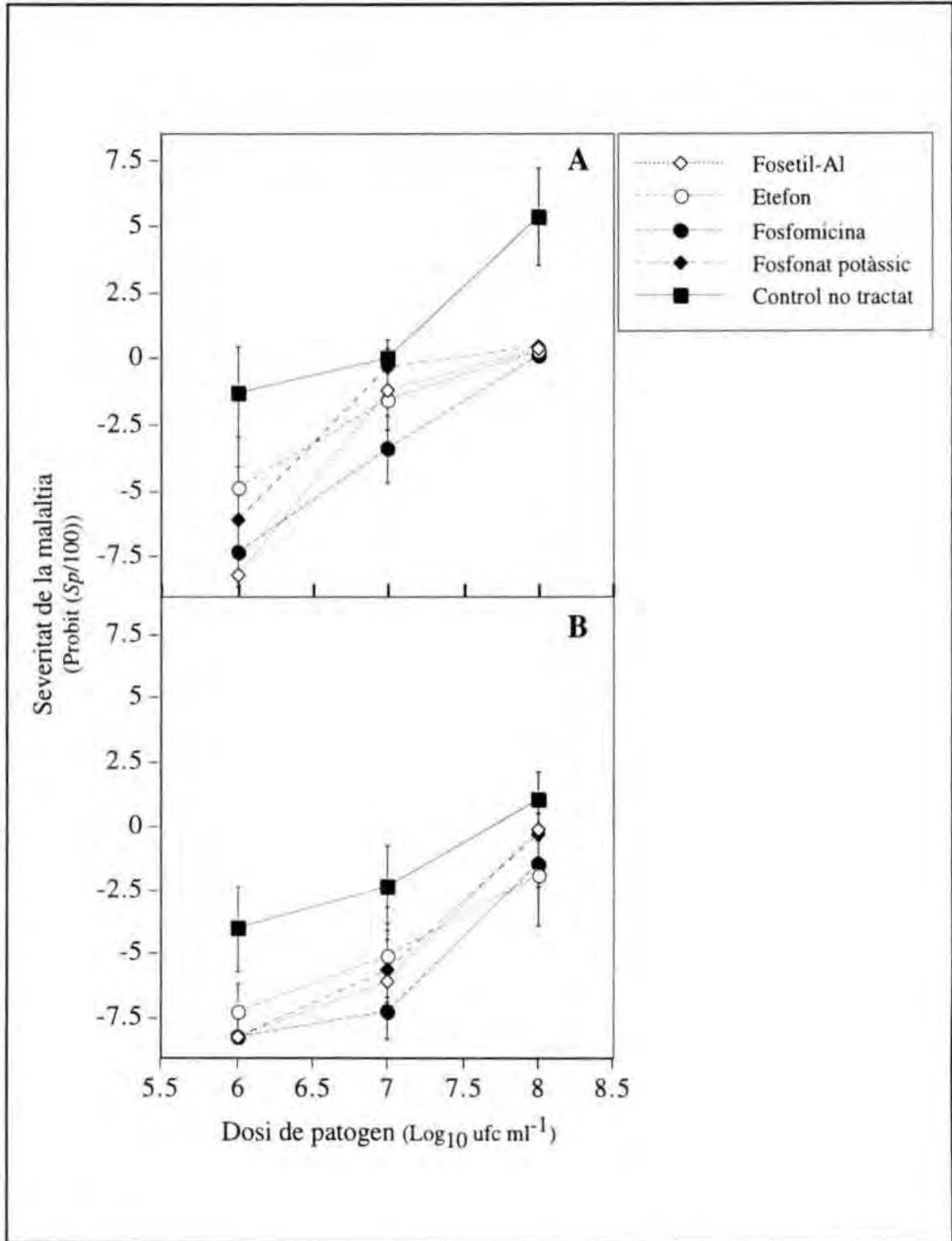
En les plantes tractades amb fosetil-Al per passar d'una severitat de la malaltia del 50% a una severitat del 90% cal augmentar la dosi de patògen en un factor de 10 aproximadament, mentre que en les plantes no tractades cal doblar la dosi de patògen.

## 1.2. Efecte de diferents fosfonats

Les variàncies de la severitat de la malaltia per planta (Probit (*Sp*)/100) dels diferents tractaments es van mostrar homogènies (en el límit) segons la prova de Bartlett ((*P*>*F*)=0.054) i els residus es van distribuir normalment segons la prova de Shapiro-Wilk (*W*= 0.98, (*P*<*W*)=0.069). L'anàlisi de la covariància va indicar un efecte molt significatiu en la severitat de la malaltia de la dosi de patògen ((*P*>*F*)<0.001), significatiu del producte ((*P*>*F*)=0.006) i de l'edat de la fulla en el límit de la significació ((*P*>*F*)<0.10). També es va observar efecte de la interacció producte-dosi de patògen en la severitat (Taula 2.10). En les fulles inoculades amb aigua estèril no es van observar símptomes d'infecció en cap dels tractaments.

En observar efecte de l'edat de la fulla (encara que en el límit) es va diferenciar entre les fulles joves (formades sobre el brot de l'any) i les fulles velles (en brots de més d'un any). Per cada tractament i repetició es van calcular els valors de severitat de la malaltia per planta en cada tipus de fulla i es van realitzar els càlculs estadístics corresponents.





**Figura 2.4.** Relació dosi-resposta entre la severitat de la malaltia per planta ( $Sp$ ) i la dosi de patogen en les fulles joves (A) i les fulles velles (B) de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb diferents fosfonats i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Les plantes es van regar diàriament durant 5 dies amb 100 ml de solucions dels diferents fosfonats a la dosi d'1.86 g  $\text{HPO}_4^{2-}$   $\text{l}^{-1}$ . Els valors corresponen a la mitjana de tres repeticions. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança per la mitjana ( $P=0.05$ ).

**Taula 2.10.** Efecte del producte, la dosi de patogen i l'edat de la fulla en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb diferents fosfonats i inoculades amb *P. syringae pv. syringae* EPS94

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
Producte	4	76.96	3.99	0.0056
Dosi patogen	1	434.65	90.11	0.0000
Edat fulla	1	14.73	3.05	0.0848
Producte x dosi patogen	4	60.39	3.13	0.0198
Producte x edat	4	8.10	0.42	0.7939
Dosi pat. x edat	1	8.37	1.73	0.1920
Error	74	342.49		

Anàlisi de la covariància realitzada amb la mitjana dels valors de severitat de la malaltia (Probit ( $Sp/100$ )) de tres repeticions de tres plantes per tractament  
 Les plantes es van tractar amb fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon o fosfomicina  
 Les inoculacions es van realitzar amb suspensions d' $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> del patogen en totes les fulles de la planta. En avaluar la severitat de la infecció es va diferenciar entre fulles joves i fulles velles de la planta

En tots els tractaments, la severitat de la malaltia va ser superior en les fulles joves que en les fulles velles (Figura 2.4). L'evolució de la severitat de la malaltia en funció de la dosi de patogen en les plantes no tractades amb fosfonats va seguir la mateixa pauta en els dos tipus de fulla. En les plantes tractades amb fosfonats l'evolució de la severitat en funció de la dosi de patogen va ser diferent segons l'edat de la fulla. Per una mateixa edat de fulla, l'increment de severitat en augmentar la dosi de patogen va seguir el mateix comportament en tots els productes. En augmentar la concentració de patogen d' $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> es va produir un augment superior en la severitat de la malaltia que en passar d' $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> en totes les fulles de les plantes no tractades amb fosfonats i en les fulles velles de les plantes tractades amb els fosfonats. En les fulles joves de les plantes tractades amb fosetil-Al, fosfonat potàssic i etefon es va produir un fort augment en la severitat de la malaltia en passar d' $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> de patogen, però un augment inferior en passar d' $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>.

Per comparar l'efecte dels productes en la severitat de la malaltia es va realitzar la prova de separació de mitjanes. Les variàncies dels valors de severitat de la malaltia en les fulles joves i en les fulles velles, per cada una de les dosis de patogen inoculades, es van mostrar homogènies segons la prova de Bartlett ( $P>F>0.05$ ) i els residus es van distribuir de forma normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W>0.90$ , ( $P<W>0.100$ )).

**Taula 2.11.** Efecte dels fosfonats en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a diferents dosis

Producte <sup>v</sup>	Severitat de la malaltia <sup>z</sup>					
	Fulles joves			Fulles velles		
	Dosi de patogen <sup>x</sup>			Dosi de patogen <sup>x</sup>		
	1 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>
Control no tractat	31.85 a	49.88 a	92.72 a	18.05 a	27.62 a	68.63 a
Fosetil-Al	0.15 b	35.65 a	66.20 b	0.12 b	8.73 b	45.55 bc
Fosfonat potàssic	8.79 a b	39.35 a	66.67 b	0.18 b	9.86 b	55.97 a b
Etefon	10.65 a b	24.30 a	61.57 b	3.73 b	11.35 b	34.68 c
Fosfomicina	2.08 b	18.75 b	56.25 b	0.11 b	4.45 b	27.56 c

<sup>v</sup> Les plantes es van regar diàriament durant 5 dies amb 100 ml de solucions de fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon o fosfomicina a la dosi d'1.86 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>. Com a control no tractat es van regar plantes amb aigua destil·lada

<sup>x</sup> Les inoculacions es van realitzar per infiltració localitzada en totes les fulles de cada planta amb *P. syringae* pv. *syringae* a les dosis de 1 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>7</sup> i 1 x 10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup>. En cada fulla es van inocular les tres dosis amb dues inoculacions per dosi. La severitat es va avaluar als 5 dies de la incubació a 25°C, 16 h llum i 18°C, 8 h foscor i 70-80% d'humiditat relativa

<sup>z</sup> Cada valor de severitat correspon a la mitjana de tres repeticions de tres plantes. Valors de severitat d'una mateixa columna (edat de la fulla i dosi de patogen) seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives d'acord amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer (P=0.05)

**Taula 2.12.** Efecte de diferents fosfonats en la dosi infectiva mitjana (DE<sub>50</sub>) de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference

Tractament <sup>x</sup>	Dosi infectiva mitjana (DE <sub>50</sub> ) <sup>z</sup>	
	Fulles joves	Fulles velles
Control no tractat	6.97 b	8.26 a
Fosetil-Al	7.99 a	8.50 a
Fosfonat potàssic	8.02 a	8.50 a
Etefon	8.09 a	9.50 a
Fosfomicina	8.29 a	9.07 a

<sup>x</sup> Les plantes es van regar diàriament durant els cinc dies previs a les inoculacions amb els fosfonats o amb aigua destil·lada (control no tractat)

<sup>z</sup> Les fulles es van inocular amb 1x10<sup>6</sup>, 1x10<sup>7</sup> i 1x10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup> del patogen. Les DE<sub>50</sub> (Log<sub>10</sub> (ufc ml<sup>-1</sup>)) es van calcular a partir de les equacions obtingudes per regressió lineal simple dels valors de severitat (*Sp*) transformats en Probit (*Sp*/100) i la dosi de patogen transformada en Log<sub>10</sub>. Els valors són la mitjana de tres repeticions

Per una mateixa edat de fulla, valors de DE<sub>50</sub> seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives d'acord amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer (P=0.05)

A la Taula 2.11 es mostren els resultats de la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ). En les fulles joves inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> es va observar una disminució significativa en la severitat de la malaltia en les plantes tractades amb fosfonats, respecte les plantes no tractades. No es van observar però, diferències entre productes. A les altres dosis de patogen i en les plantes tractades amb fosfomicina es va observar una reducció significativa de la severitat de la malaltia respecte les plantes no tractades. En les fulles velles, per totes les dosis de patogen, el tractament amb fosfonats va reduir significativament la severitat de la malaltia. Només a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> però, es van observar diferències entre fosfonats. A aquesta dosi de patogen, el fosetil-Al, l'etefon i la fosfomicina van ser els que van produir una reducció de la malaltia significativament superior.

Per cada tractament i repetició es van obtenir, per regressió lineal simple, les equacions que relacionen la dosi de patogen ( $\text{Log}_{10}$ ) amb la severitat de la malaltia ( $Sp$ ) transformada en Probit ( $Sp/100$ ). Les funcions obtingudes van presentar un bon ajust ( $R^2 > 0.5$ ) i van ser significatives ( $(P > F) < 0.05$ ). Els residus es van distribuir normalment d'acord amb la prova de Shapiro-Wilk ( $W > 0.80$  i  $(P < W) > 0.10$ ). A partir d'aquestes funcions es va estimar la dosi infectiva mitjana de patogen ( $DE_{50}$ ). Es van comparar les  $DE_{50}$  dels diferents tractaments mitjançant la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer (Taula 2.12). Les variàncies dels valors de les  $DE_{50}$  pels diferents tractaments van ser homogènies segons la prova de Bartlett, tant en les fulles joves ( $(P > F) = 0.188$ ) com en les fulles velles ( $(P > F) = 0.063$ ), i els residus es van distribuir de forma normal ( $W = 0.91$ ,  $(P < W) = 0.132$  i  $W = 0.96$ ,  $(P < W) = 0.698$ , respectivament). La  $DE_{50}$  en les fulles joves de les plantes tractades amb els fosfonats va ser significativament superior a la de les plantes no tractades. En les plantes tractades amb fosfonats van ser necessàries concentracions de patogen 10 vegades superiors que en les no tractades per obtenir una severitat de la malaltia del 50 %. En les fulles joves no es van observar diferències significatives entre fosfonats, tot i que en les plantes tractades amb etefon i fosfomicina es van obtenir valors de  $DE_{50}$  superiors. En les fulles velles, la  $DE_{50}$  va ser de l'ordre de 10 vegades superior a la de les fulles joves, per tots els tractaments. En aquestes fulles no es van observar diferències significatives en les  $DE_{50}$  de les plantes tractades amb els diferents productes ni entre les plantes tractades i les no tractades (Tukey-Kramer,  $P=0.05$ ).

## 2. Multiplicació de *P. syringae* pv. *syringae* en plantes de perera tractades amb fosfonats

Les variàncies del nombre de bacteris viables a les 0, 24 i 48 h de la incubació en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfonats i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a diferents dosis, van mostrar-se homogènies segons la prova de Bartlett ( $P=0.874$ ) i els residus van presentar una distribució normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.97$ ,  $(P>W)=0.320$ ). L'anàlisi de la covariància va indicar un efecte significatiu de la dosi de patogen en la multiplicació bacteriana en les fulles inoculades (Taula 2.13). El temps d'incubació i la interacció temps-dosi de patogen van mostrar un efecte en el límit de la significació ( $(P>F)<0.10$ ). No es va observar efecte significatiu del producte en la multiplicació bacteriana, però sí un efecte molt significatiu ( $(P>F)<0.001$ ) de la interacció producte-temps d'incubació. Segons això, l'efecte del producte en la multiplicació bacteriana és influenciat per la durada de la incubació. En el model d'anàlisi de la covariància es va obtenir una relativament baixa variabilitat no explicada pels factors del model, corresponent a la component d'error (26%).

**Taula 2.13.** Efecte dels fosfonats i la dosi de patogen en la multiplicació de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en fulles en plantes de perera de la varietat Conference

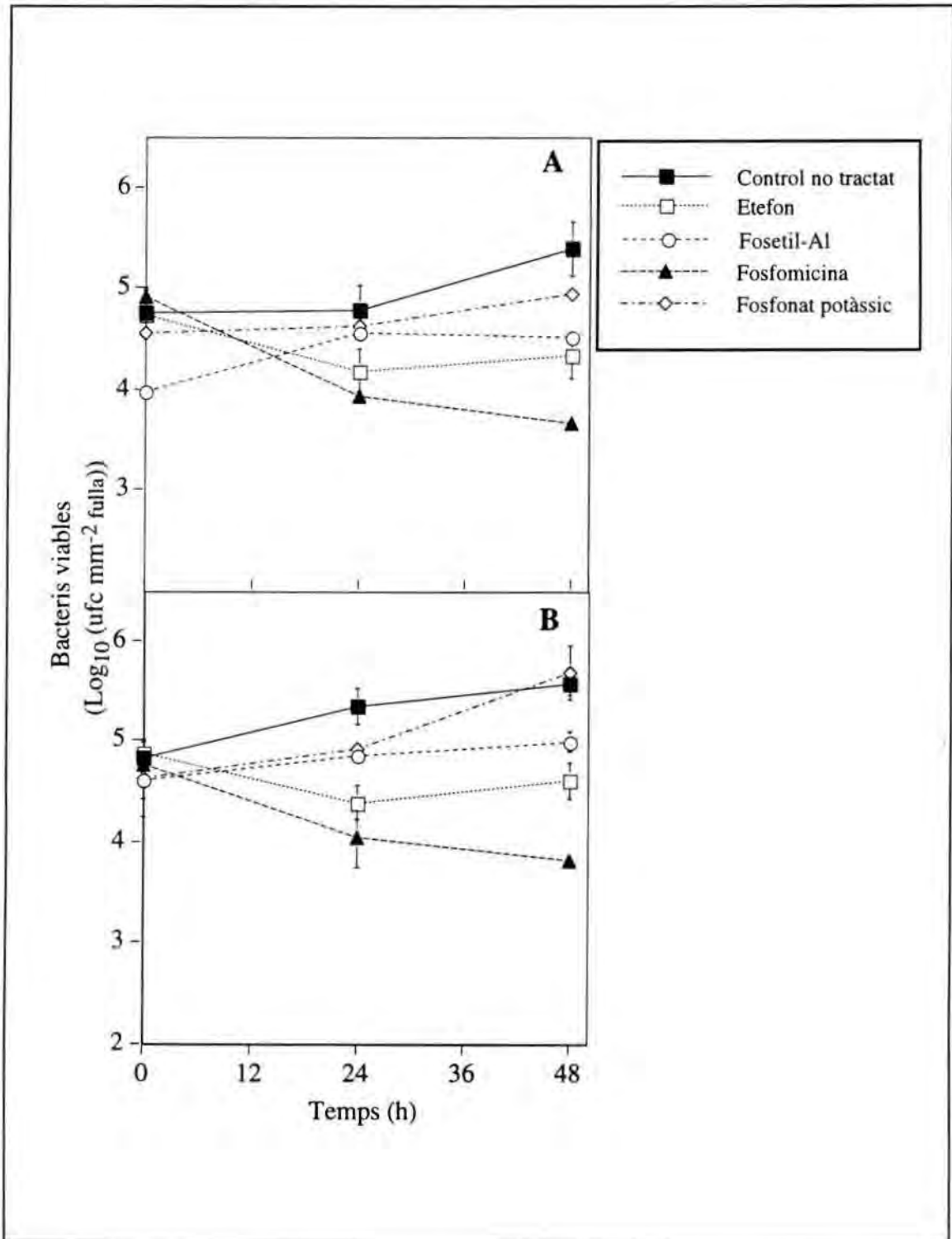
<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
Producte <sup>a</sup>	4	0.40	1.14	0.3500
Dosi de patogen <sup>b</sup>	1	0.61	6.99	0.0110
Temps incubació <sup>c</sup>	1	0.29	3.35	0.0740
Producte x temps	4	3.15	9.00	0.0000
Temps x dosi patogen	1	0.30	3.42	0.0712
Producte x dosi patogen	4	0.38	1.09	0.3740
Error	74	3.15		

Anàlisi de la covariància realitzada amb la mitjana del nombre de bacteris viables ( $\text{Log}_{10}$  ufc  $\text{mm}^{-2}$ ) de tres repeticions de tres plantes per tractament

<sup>a</sup> Es van regar plantes de perera de la varietat Conference durant 5 dies amb solucions de fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon, fosfomicina a la dosi d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}$   $\text{l}^{-1}$  o aigua (control no tractat)

<sup>b</sup> Es va inocular la soca EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* per microinfiltració localitzada en les fulles a les dosis d' $1 \times 10^7$  i  $1 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$

<sup>c</sup> Es van fer recomptes del nombre de bacteris viables de la soca inoculada en les fulles a les 0, 24 i 48 hores de la incubació de les plantes



Tot i no observar efecte significatiu del producte en la multiplicació bacteriana segons el model global de l'anàlisi de la covariància (Taula 2.13), l'evolució de la població bacteriana en les fulles al llarg del temps va ser diferent en funció del fosfonat aplicat i de la dosi d'inòcul (Figura 2.5).

En les plantes no tractades amb fosfonats la població bacteriana va augmentar al llarg de la incubació. En les plantes tractades amb fosetil-Al i fosfonat potàssic la població bacteriana es va mantenir estable al llarg del temps. Fins i tot en les plantes tractades amb fosfonat potàssic i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, es va observar un augment de la població bacteriana al llarg del temps similar al produït en les plantes no tractades amb fosfonats. En les plantes tractades amb etefon, a les 24 hores de la incubació, es va observar una disminució de la població bacteriana respecte la inicial. A les 48 hores es van mantenir els nivells poblacionals observats a les 24 hores. La població bacteriana en les plantes tractades amb fosfomicina va disminuir considerablement al llarg de la incubació, assolint a les 48 hores nivells poblacionals 10 vegades inferiors als inicials.

### 3. Canvis estructurals en els teixits de perera durant la interacció amb *P. syringae* pv. *syringae*. Efecte dels fosfonats

#### 3.1. Síntomes macroscòpics

En les plantes no tractades amb fosfonats i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* per microinfiltració localitzada en les fulles es van observar els símptomes característics del desenvolupament de la malaltia. A partir dels 3 dies de les inoculacions es va observar l'aparició de necrosis progressives a partir del punt d'inoculació, més severes a la dosi de patogen d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>. Les necrosis desenvolupades eren brunes i hidratades, amb els teixits turgents (Figura 2.6 A). El límit entre teixit necrosat i teixit sa era difús. Als 5 dies de les inoculacions es van observar necrosis ben desenvolupades en les fulles inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* a les dues dosis ( $1 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> i  $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>).

En les plantes tractades amb els fosfonats i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 els símptomes van ser diferents en funció del producte i la dosi de patogen. En les plantes tractades amb fosfonats no es van observar símptomes clars fins als 5 dies de les inoculacions.

A la dosi d' $1 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> en les fulles de les plantes tractades amb etefon i en les tractades amb fosfomicina no es van desenvolupar símptomes, mentre que en les tractades amb fosfonat potàssic i fosetil-Al es van observar necrosis localitzades al punt d'inoculació. A la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 es van observar necrosis en les fulles de tots el tractaments. Les necrosis eren de consistència seca, amb el límit entre el teixit sa i el teixit necrosat ben delimitat (Figura 2.6 B, C i D). L'extensió de la necrosi va ser diferent en funció del fosfonat aplicat. En les plantes tractades amb fosfomicina es van observar necrosis localitzades al punt d'inoculació (Figura 2.6 D). En les plantes tractades amb etefon es van formar necrosis localitzades al punt d'inoculació o bé ocupant una superfície reduïda al voltant del punt d'inoculació i envoltades per un halo cloròtic (Figura 2.6 C). En les plantes tractades amb fosfonat potàssic o amb fosetil-Al la superfície necrosada va ser superior a l'observada amb els altres productes, però inferior a la de les plantes no tractades (Figura 2.6 B). Les necrosis desenvolupades eren seques i sovint limitades també per un halo cloròtic. En les fulles inoculades amb aigua estèril no es van observar símptomes d'infecció.





**Figura 2.6.** Síntomes de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 als 7 dies de la inoculació per microinfiltració en fulles en plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació amb fosetil-Al (B), etefon (C) i fosfomicina (D). A, control no tractat amb fosfonats.

### 3.2. Síntomes microscòpics

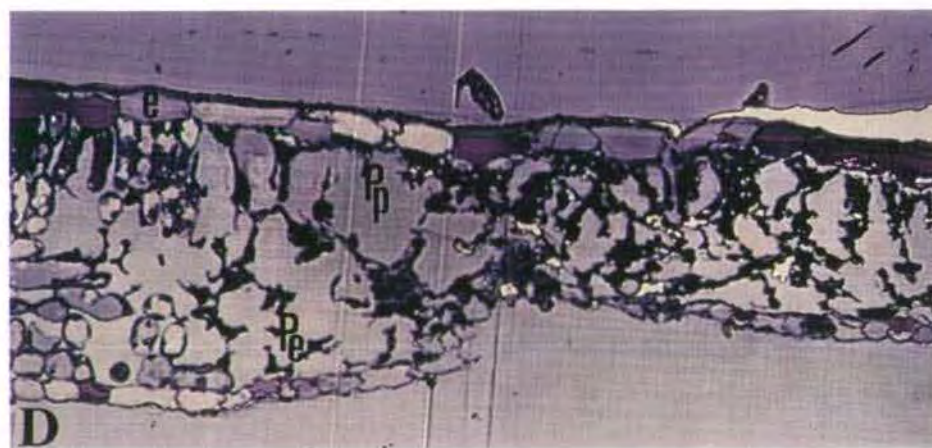
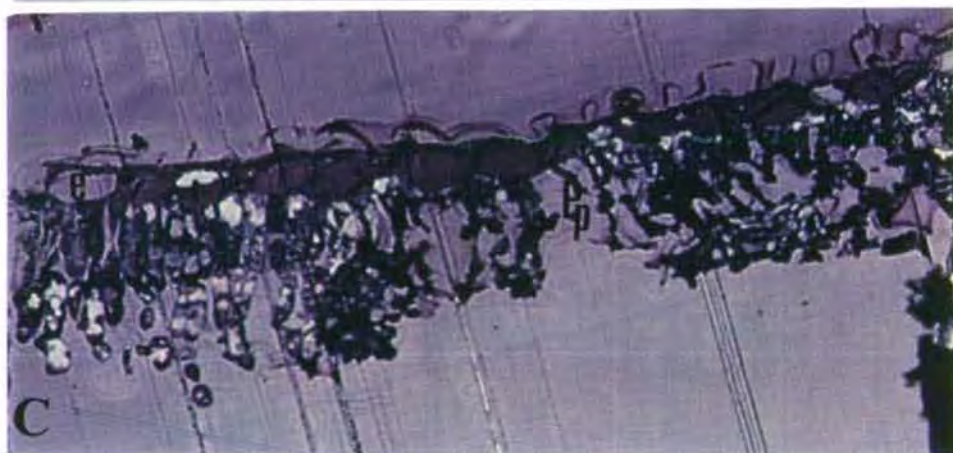
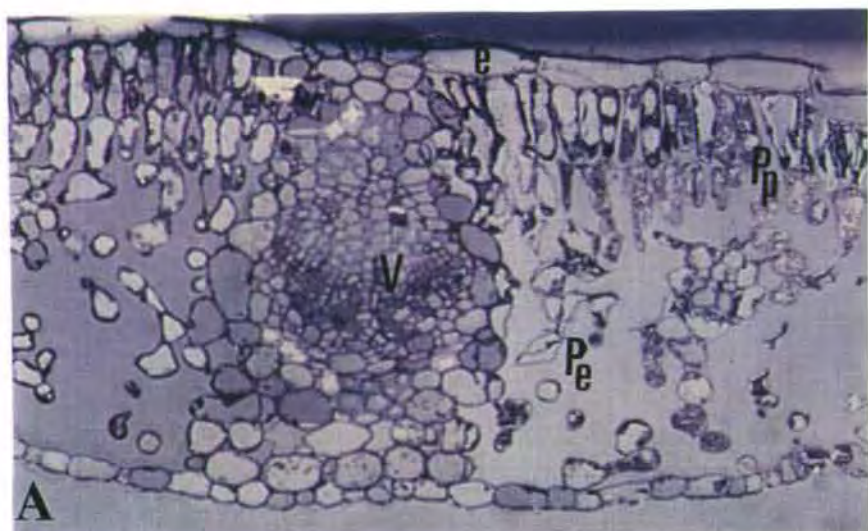
Es van observar al microscopi òptic els teixits de les fulles dels diferents tractaments inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>. L'observació es va realitzar a les 48 hores de les inoculacions (Figures 2.7 i 2.8).

En les fulles de plantes no tractades amb fosfonats i inoculades amb aigua destil·lada els teixits del mesofil·le de la fulla i l'epidermis van mantenir la seva estructura, amb els dos tipus de parènquima diferenciats i les cèl·lules ben estructurades. En les plantes no tractades i inoculades amb el patogen, en la zona de la infecció es va observar una desorganització dels teixits, en concret del parènquima esponjós, en el que les cèl·lules van quedar disperses pel mesofil·le. L'epidermis i els feixos conductors van mantenir l'estructura. Les cèl·lules van mantenir la seva estructura, quedant limitades per la paret cel·lular (Figures 2.7 A, 2.8).

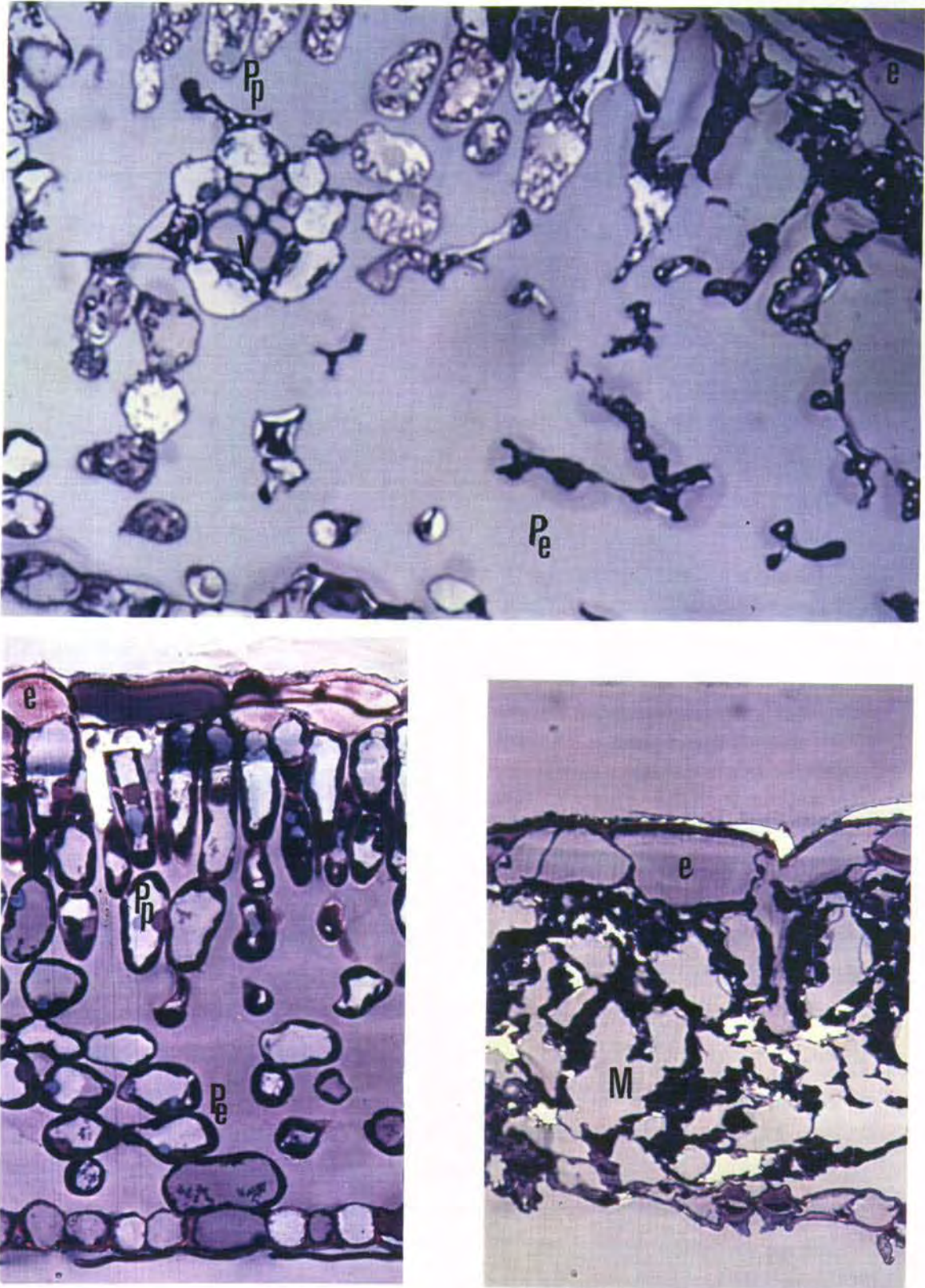
En les fulles de les plantes tractades amb fosfonats i inoculades amb el patogen es van observar canvis en l'estructura dels teixits i de les cèl·lules. Els canvis observats van ser diferents en funció del fosfonat aplicat.

En les fulles de plantes tractades amb fasetil-Al i fosfonat potàssic i inoculades amb el patogen, la fulla no va perdre la integritat, mantenint l'epidermis de l'anvers i del revers contínua (Figures 2.7B i 2.8). El parènquima esponjós es va desorganitzar de forma similar a les plantes no tractades, però les cèl·lules van presentar una estructura diferent, ja que en l'interior de la cèl·lula, limitant la paret cel·lular, es va observar una zona més tenyida pel blau de metilè, no observada en les cèl·lules de les plantes no tractades. En les plantes tractades amb etefon o fosfomicina es van observar modificacions en l'estructura dels teixits de la fulla en la zona inoculada amb els bacteris (Figures 2.7 C i D). Es va produir una desintegració del mesofil·le de la fulla amb la pèrdua de l'estructura de les cèl·lules parenquimàtiques. El mesofil·le va quedar ocupat per agregats cel·lulars.

En tots els tractaments, fora de la zona infiltrada amb bacteris no es van observar modificacions en l'estructura dels teixits i de les cèl·lules de la fulla.



**Figura 2.7.** Talls semifins de fulles de plantes de perera de la varietat Conference realitzats a les 48 hores de la inoculació per microinfiltració de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a la dosi de  $10^8$  ufc  $ml^{-1}$ . **A**, Plantes regades amb aigua (control no tractat amb fosfonats); **B**, plantes tractades amb fosfonat potàssic; **C**, plantes tractades amb fosfomicina; **D**, plantes tractades amb etefon. Observacions al microscopi òptic dels teixits de la zona infiltrada amb els bacteris (X 214). Tinció amb blau de metilè (solució aquosa al 0.5%). Pp= parènquima en palissada; Pe= parènquima esponjós; e= epidermis; V= teixits conductors.



**Figura 2.8.** Talls semifins de fulles de plantes de perera de la varietat Conference realitzats a les 48 hores de la inoculació per microinfiltració de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a la dosi de  $10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ . Imatge superior, plantes no tractades amb fosfonats (X 536). Imatges inferiors, plantes tractades amb fosfonat potàssic (esquerra) i etefon (dreta) (X 428). Observacions al microscopi òptic dels teixits de la zona infiltrada amb els bacteris. Tinció amb blau de metilè (solució aquosa al 0.5%). Pp= parènquima en palissada; Pe=parènquima esponjós; M= mesofil.le; e= epidermis de l'anvers; V= feixos conductors.

### 3.3. Canvis ultraestructurals

Es van realitzar observacions de la ultraestructura dels teixits de fulles de plantes tractades amb els fosfonats i infiltrades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a la dosi d' $1 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>. Es van observar discs de fulla de la zona infiltrada a les 48 hores de la inoculació. Les observacions es van realitzar al microscopi electrònic de rastreig i al microscopi electrònic de transmissió.

#### *Observacions al microscopi electrònic de rastreig*

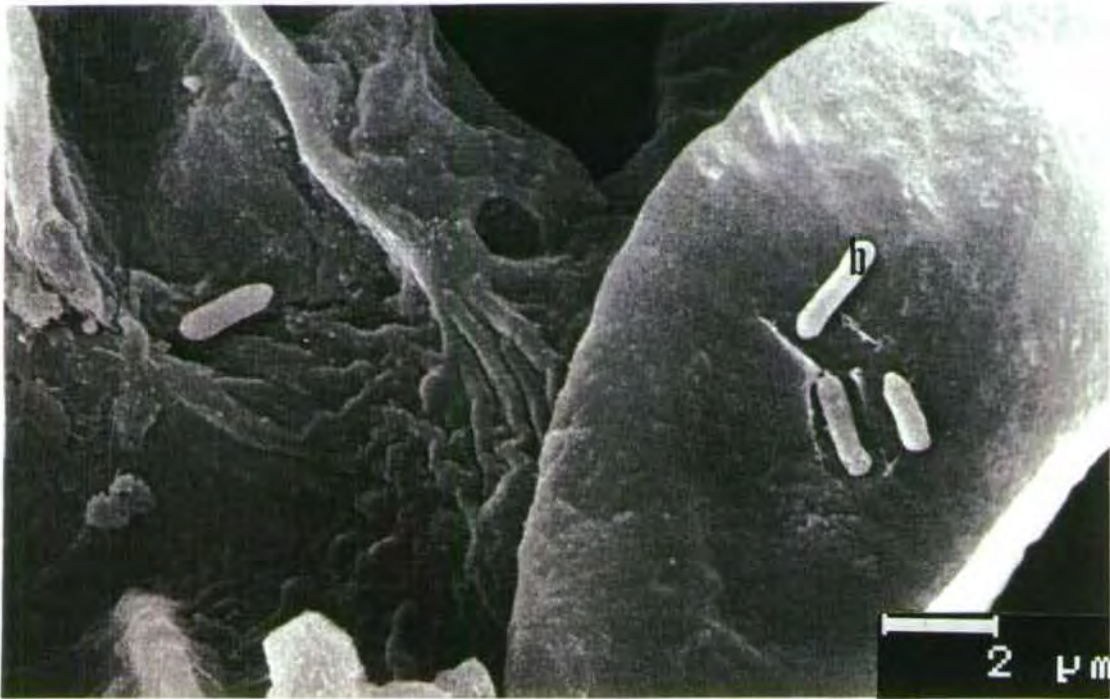
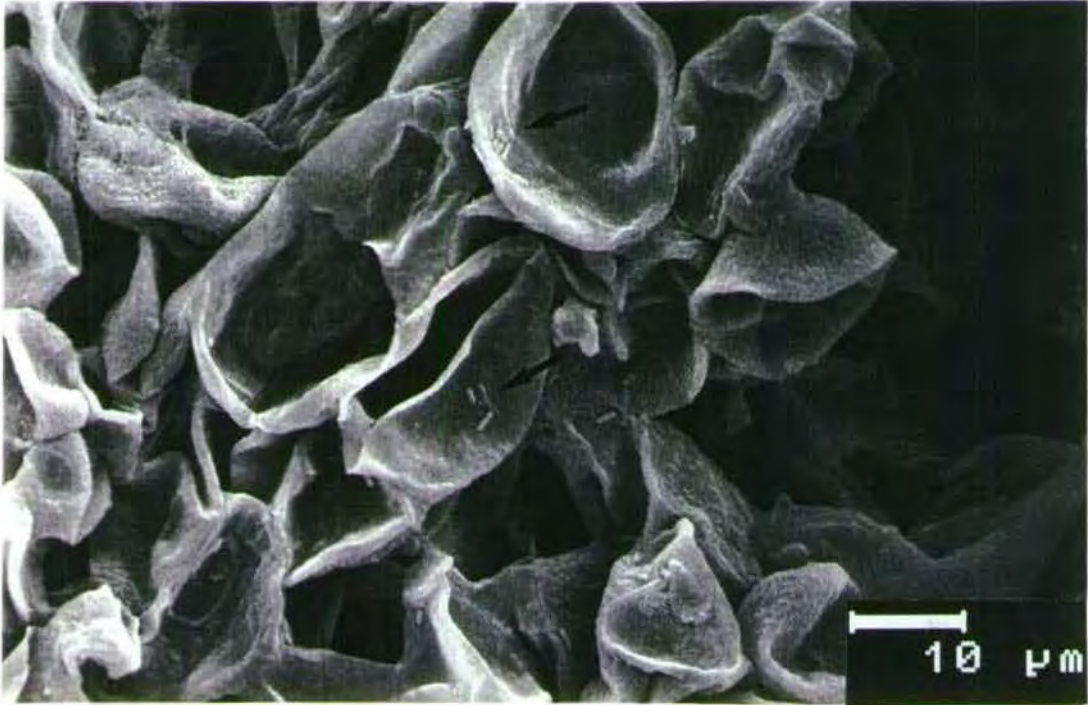
En les fulles de plantes no tractades amb fosfonats i inoculades amb el patogen es va observar la presència del bacteri en l'interior del teixit infectat. Les cèl·lules bacterianes estaven localitzades en l'espai intercel·lular adherides a la paret cel·lular, en la superfície de les cèl·lules parenquimàtiques (Figura 2.9). Fora de la zona infiltrada no es van observar bacteris. Les cèl·lules vegetals de la zona infectada es van mantenir turgents.

En les fulles de plantes tractades amb els fosfonats es va observar una menor presència de cèl·lules bacterianes en els teixits de la zona inoculada. En les fulles de plantes tractades amb fosetil-Al, les cèl·lules del mesofil·le de la zona infiltrada amb bacteris van perdre el contingut cel·lular, observant-se cèl·lules buides limitades per la paret cel·lular (Figura 2.10). En les plantes tractades amb fosfonat potàssic les cèl·lules del mesofil·le van mantenir el contingut cel·lular i la turgència, tot i la presència de bacteris en la seva superfície. En aquest tractament es va observar la presència d'agregats fibril·lars en la superfície de la paret de les cèl·lules vegetals, ocupant l'espai intercel·lular juntament amb els bacteris (Figura 2.11). En les plantes tractades amb fosfomicina es va observar la pèrdua de l'estructura dels teixits del mesofil·le de la fulla en la zona inoculada, juntament amb la presència d'alguna cèl·lula bacteriana, i la formació d'agregats fibril·lars en l'espai intercel·lular (Figura 2.12). En les plantes tractades amb etefon, en la zona infiltrada amb el patogen, es va observar la pèrdua de l'estructura dels teixits i de la integritat de les cèl·lules (Figura 2.13).

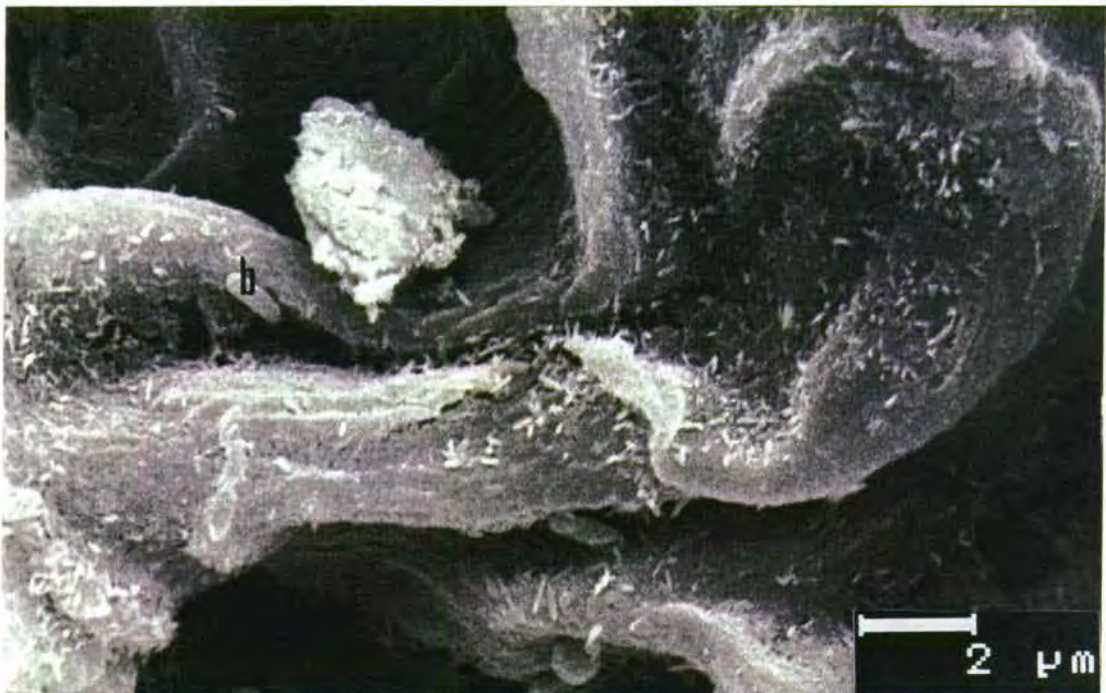
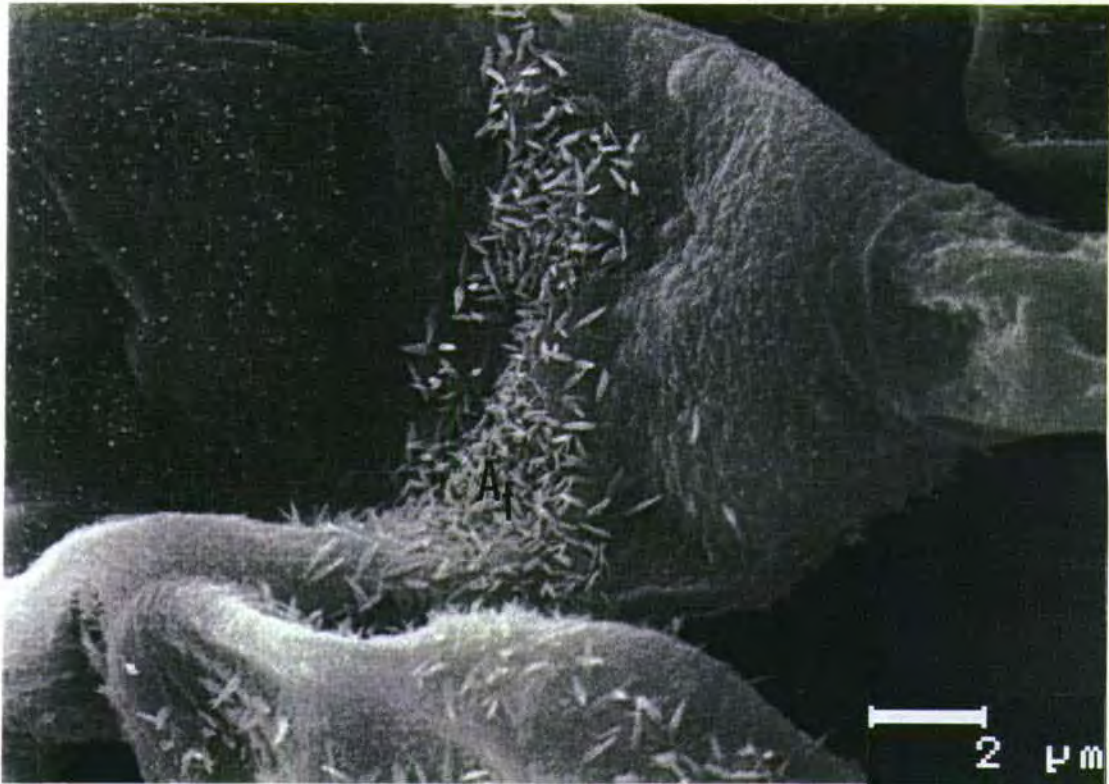
En general, en les plantes tractades amb els fosfonats, fora de la zona inoculada amb bacteris no es van observar modificacions en les cèl·lules ni en els teixits del mesofil·le de la fulla, ni presència de cèl·lules bacterianes.



**Figura 2.9.** Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil·le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 (interacció compatible), a les 48 hores de la inoculació. Cèl·lules parenquimàtiques de la zona infiltrada amb els bacteris. S'observen cèl·lules bacterianes (b) en l'espai intercel·lular establint contacte directe amb la superfície de les cèl·lules vegetals.

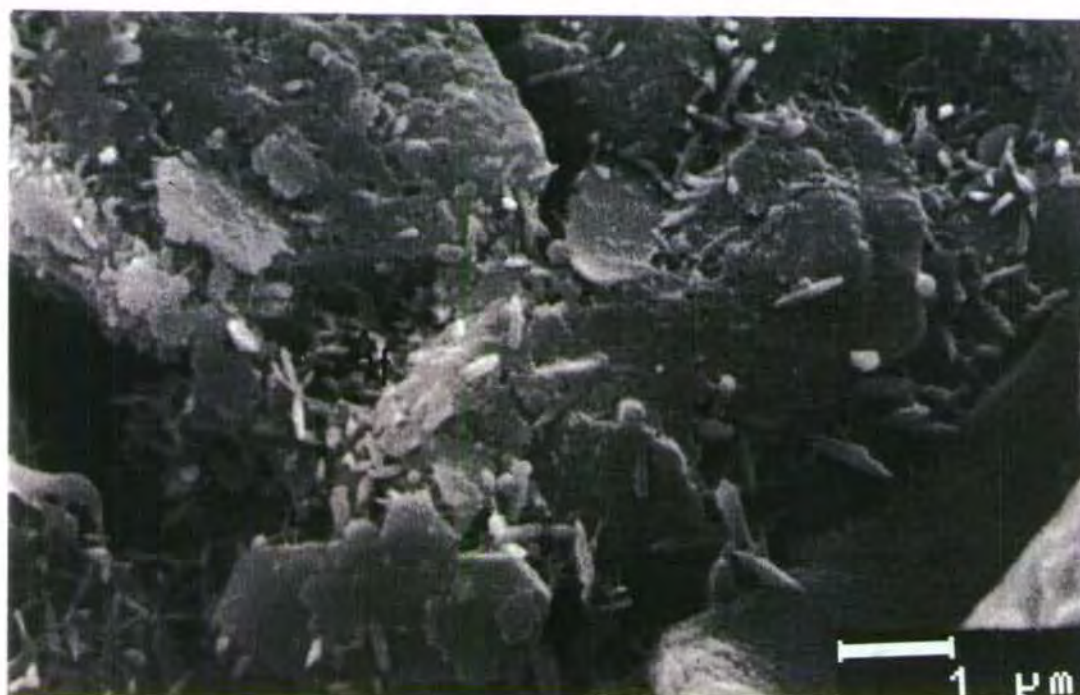
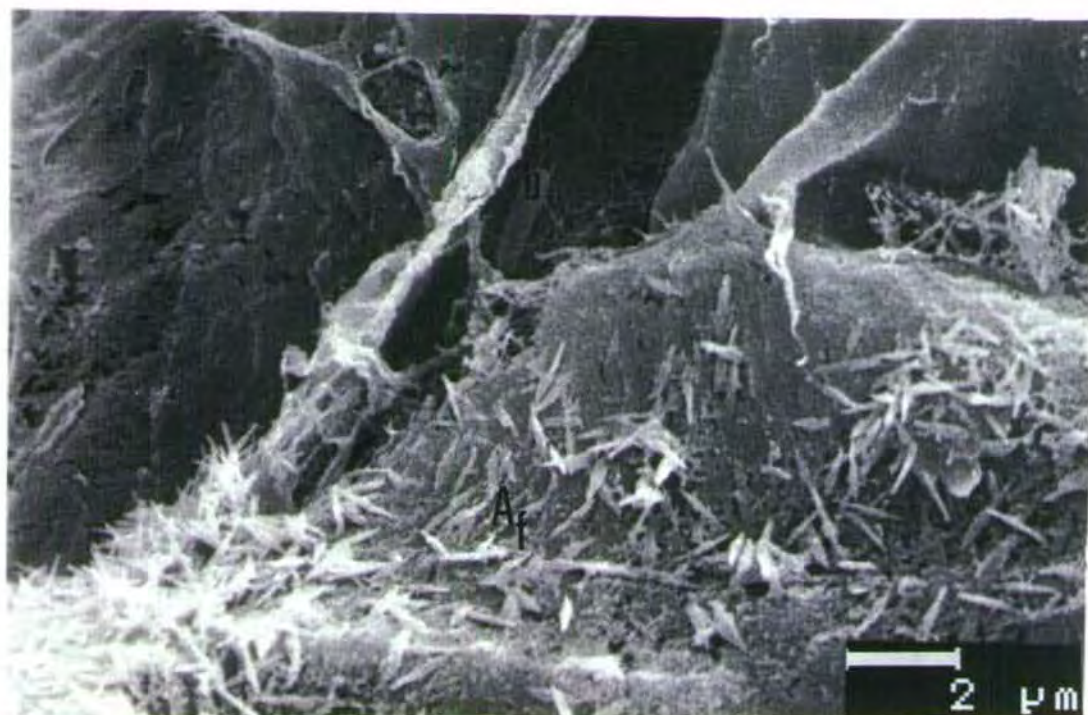


**Figura 2.10.** Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil·le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosetil-Al i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Les imatges corresponen al punt d'infiltració dels bacteris. Es pot observar la pèrdua del contingut i de turgència de les cèl·lules parenquimàtiques amb cèl·lules bacterianes (b, fletxa) en la seva superfície.

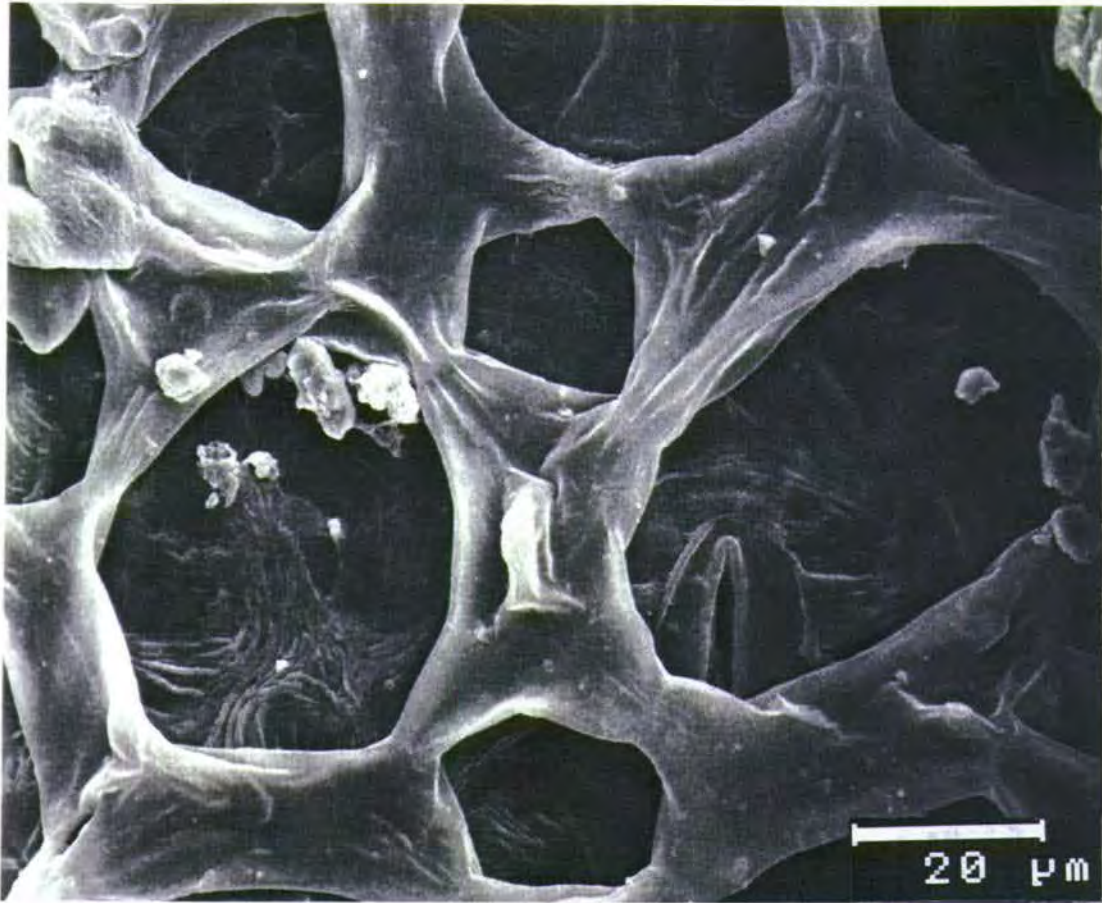


**Figura 2.11.** Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil·le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfonat potàssic i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Les imatges corresponen al punt d'infiltració dels bacteris. Les cèl·lules parenquimàtiques mantenen la turgència. En l'espai intercel·lular, s'observa la presència d'agregats fusiformes (Af) en la superfície de les cèl·lules vegetals juntament amb cèl·lules bacterianes (b).





**Figura 2.12.** Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil·le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfomicina i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Cèl·lules parenquimàtiques del punt d'infiltració dels bacteris. Es pot observar la presència d'agregats fusiformes (Af) en la superfície de les cèl·lules vegetals juntament amb alguna cèl·lula bacteriana (b).



**Figura 2.13.** Micrografies al microscopi electrònic de rastreig del mesofil·le de fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb etefon i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. **Superior**, els teixits de la fulla en la zona d'infiltració dels bacteris han perdut l'estructura i les cèl·lules parenquimàtiques s'han desorganitzat. **Inferior**, s'observa la presència de pocs bacteris (b) en mig del teixit desorganitzat.

*Observacions al microscopi electrònic de transmissió*

Les micrografies electròniques dels teixits foliars de plantes no tractades amb fosfonats i infiltrades amb aigua, a les 48 hores de la infiltració, van mostrar les cèl·lules del mesofil·le amb estructura normal, sense alteracions en els seus components i orgànuls (Figura 2.14). La paret cel·lular estava limitada internament pel plasmalemma. La membrana plasmàtica era contínua i el tonoplast ben diferenciat. Els cloroplasts i mitocondris, situats pròxims a la paret cel·lular, mantenien l'estructura, limitats per les membranes externes. En el citoplasma cel·lular es van observar grans vacuols. Els cloroplasts presentaven estructura normal, amb estroma i grana ben diferenciats i amb midó i alguns grànuls osmiofílics en el seu interior. Les cèl·lules parenquimàtiques del mesofil·le de la fulla eren turgents i formant un teixit continu, limitades per la paret cel·lular i l'espai intercel·lular. En l'espai intercel·lular, limitant amb la cara externa de la paret cel·lular, no es van observar cèl·lules bacterianes ni material electrodens.

Per tots els tractaments, en els teixits de fora de la zona inoculada de les fulles infiltrades amb *P. syringae* pv. *syringae*, no es van observar canvis en l'estructura cel·lular ni dels orgànuls respecte el control inoculat amb aigua. En els teixits de la zona infiltrada, en canvi, l'estructura cel·lular es va veure modificada. Les modificacions van ser diferents en funció del tractament.

En la zona infiltrada amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en fulles de plantes no tractades amb fosfonats (situació compatible) es va observar la presència de bacteris en l'espai intercel·lular, molt propers a la paret cel·lular vegetal (Figura. 2.15). Gran part de les cèl·lules vegetals mantenien la seva estructura, mentre que altres, corresponents a la zona en que s'havien desenvolupat necrosis, havien perdut l'estructura interna. En aquestes cèl·lules el plasmalemma havia perdut la continuïtat, de manera que els orgànuls cel·lulars estaven dispersos pel citoplasma, el qual era més electrodens. Es va observar també, en aquestes cèl·lules l'alteració de l'estructura de la membrana dels cloroplasts i la dispersió dels grana i de midó pel citoplasma cel·lular, amb pèrdua de l'estroma. En totes les cèl·lules vegetals que presentaven bacteris interaccionant amb la paret cel·lular es va observar la presència de material granular electrodens en la cara externa de la paret cel·lular, a prop de les cèl·lules bacterianes. Aquest material estava en contacte amb la superfície de les cèl·lules bacterianes, les quals sovint presentaven estructures granulars electrodenses connectades amb la membrana externa. Algunes cèl·lules bacterianes mantenien contacte directe amb la paret cel·lular vegetal. Cal destacar que es van observar cèl·lules bacterianes en divisió en l'espai intercel·lular.

En les plantes tractades amb fosfonats els canvis en l'estructura dels teixits i cèl·lules vegetals, la localització dels bacteris i, la seva estructura van ser diferents en funció del producte.

En les plantes tractades amb fosfonat potàssic, en l'espai intercel·lular de la zona infiltrada amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94, es va observar la presència de bacteris propers a les parets cel·lulars vegetals (Figura 2.16). En general, no es va observar material granular electrodens en la part externa de la paret cel·lular vegetal de zones properes als bacteris. Tampoc es van observar estructures electrodenses en la membrana externa bacteriana. La majoria de les cèl·lules del mesofil·le amb presència de bacteris propers a la paret cel·lular van mantenir la seva estructura, tot i que en altres es va observar la pèrdua de la continuïtat del plasmalemma, alteracions en la membrana plasmàtica i pèrdua de l'estroma i membrana externa del cloroplast. Entre la paret cel·lular i la membrana plasmàtica de la cèl·lula vegetal es va observar la presència d'agregats vesiculars o material granular. En casos més extrems, les cèl·lules vegetals havien perdut el contingut cel·lular i aquest ocupava l'espai intercel·lular juntament amb els bacteris. El teixit del mesofil·le de la fulla deixava de ser continu com a conseqüència de la desorganització cel·lular.

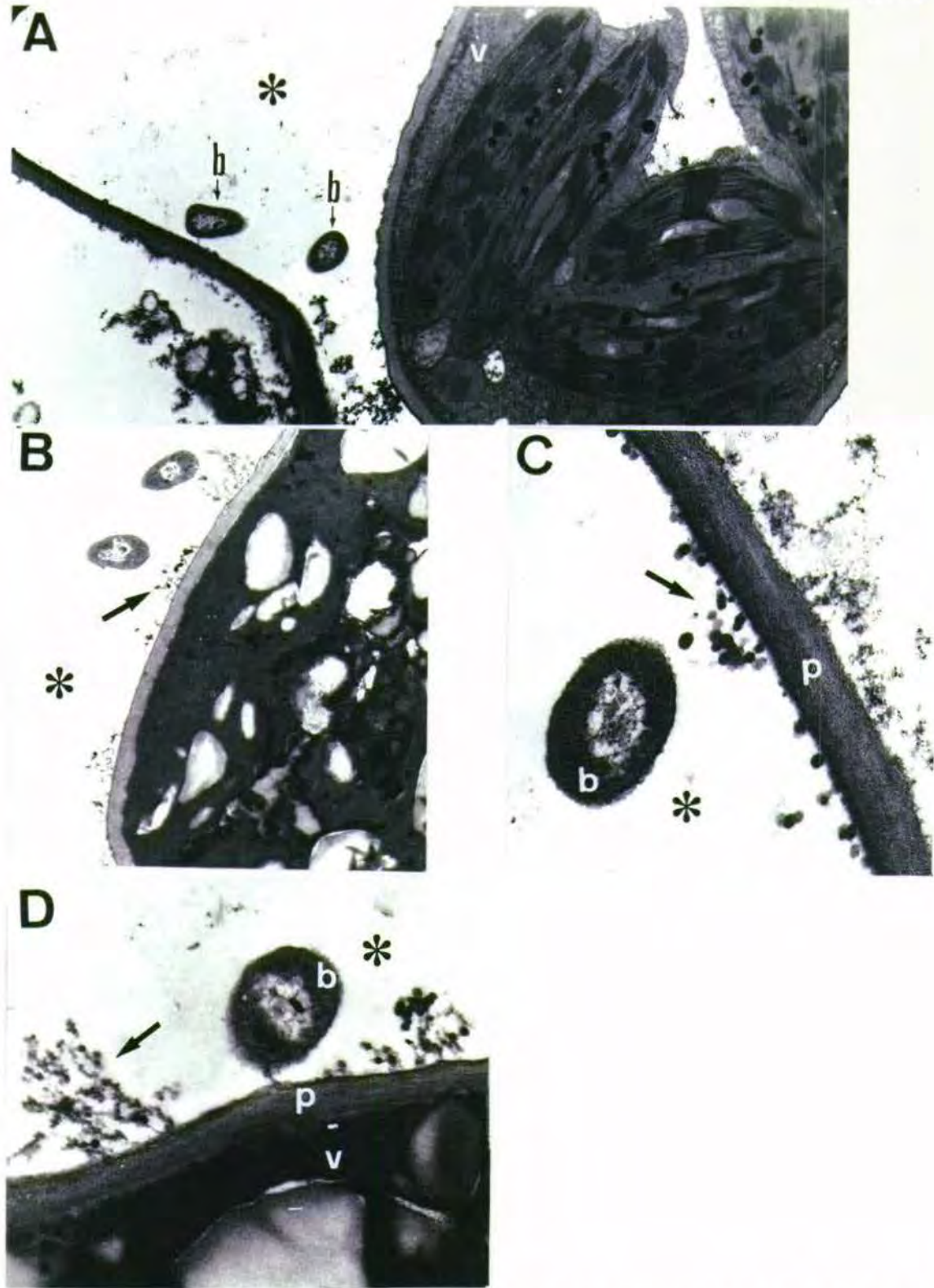
En les plantes tractades amb etefon en la zona infiltrada amb el patogen es va observar la presència de bacteris en l'espai intercel·lular, sovint formant agregats de bacteris limitats per les parets de cèl·lules vegetals veïnes (Figura 2.17). La paret cel·lular vegetal semblava més gruixuda que en els controls no tractats amb etefon. El bacteris quedaven limitats per les cèl·lules vegetals en l'espai intercel·lular, o bé envoltats per contingut cel·lular que havia passat a l'espai intercel·lular. També es van observar cèl·lules bacterianes envoltades per material fibril·lar en contacte amb la paret cel·lular vegetal. Les cèl·lules vegetals van presentar desorganització i pèrdua de turgència. El plasmalemma va perdre la continuïtat i els cloroplasts van perdre la membrana i l'estroma, quedant els grana repartits per l'interior de la cèl·lula. No es van observar vacuols en les cèl·lules vegetals i el citoplasma era més electrodens.

En les plantes tractades amb fosfomicina es van observar canvis en les cèl·lules vegetals i en els bacteris (Figura 2.18). Es van observar bacteris en l'espai intercel·lular, propers a la paret cel·lular vegetal limitats o envoltats per una matriu fibril·lar i per agregats o vesícules citoplasmàtiques. L'estructura dels bacteris era modificada, observant-se el trencament de la paret cel·lular bacteriana i la sortida del contingut cel·lular a l'exterior, amb la conseqüent mort bacteriana. Els teixits de la zona infiltrada amb

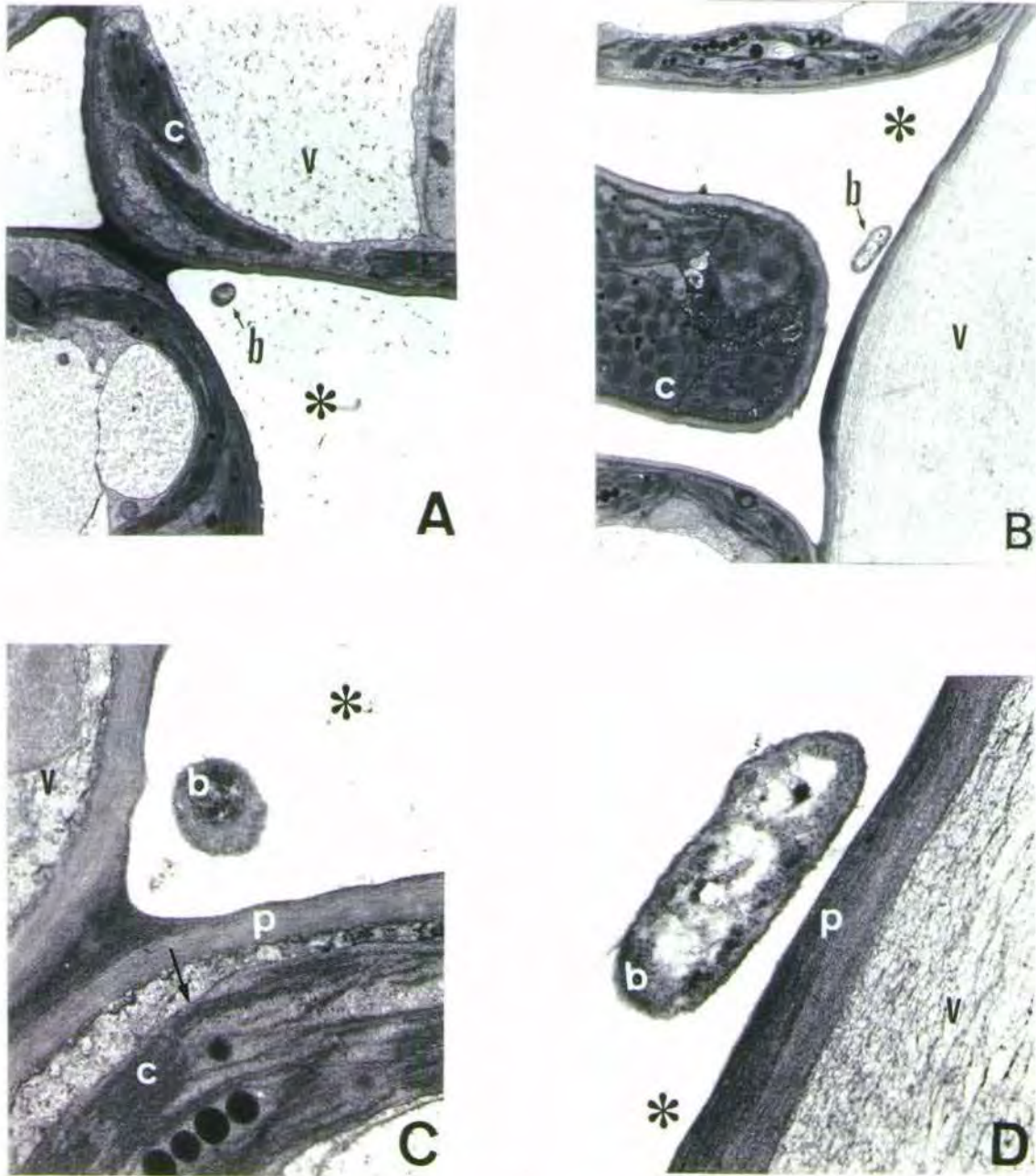
bacteris havien perdut la continuïtat, degut a la pèrdua d'estructura de les cèl·lules vegetals. Es van observar les mateixes modificacions en els components citoplasmàtics que en les cèl·lules de plantes tractades amb etefon: modificació del plasmalemma, alteració de la membrana cel·lular i dels cloroplasts. Es va produir la migració del contingut citoplasmàtic cap al centre de la cèl·lula, fenomen lligat a la pèrdua de la turgència de les cèl·lules vegetals amb la separació de la membrana plasmàtica de la paret cel·lular (Figura.2.18). El mesofil·le de la fulla havia perdut la continuïtat com a conseqüència de l'alteració de les cèl·lules parenquimàtiques.



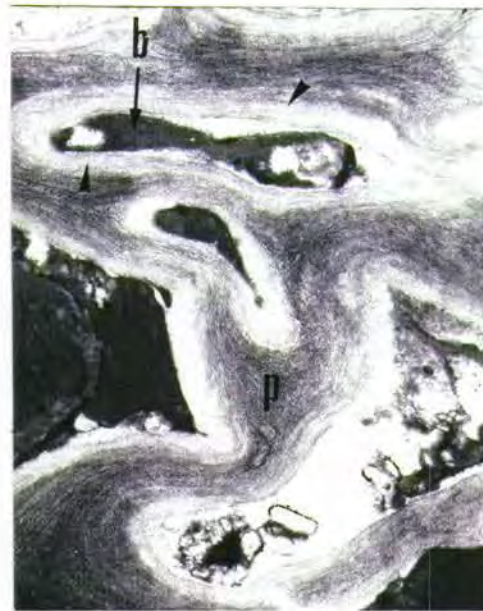
**Figura 2.14.** Microelectrografia al microscopi electrònic de transmissió d'un tall ultrafi de fulla de perera infiltrada amb aigua destil·lada estèril. Cèl·lules parenquimàtiques del mesofil·le de la fulla (X 21000). Les cèl·lules presenten una estructura regular (turgents, en contacte les unes amb les altres) en les que s'observa l'organització cel·lular, amb el plasmalemma (fletxa) continu i proper a la paret cel·lular (p) i els cloroplasts (c) limitats per la membrana externa (cap de fletxa), també es poden observar les vesícules de Golgi (g) i els mitocondris (m). En l'espai intercel·lular no s'observen bacteris ni estructures granulars.



**Figura 2.15.** Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulles de plantes de perera no tractades amb fosfonats infiltrades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. **A**, s'observen bacteris (b) en l'espai intercel.lular (\*) propers o en contacte amb les cèl.lules vegetals (v) (X 10600). Es pot observar el manteniment de l'estructura de la cèl.lula vegetal de la dreta (v) i la desorganització interna de la de l'esquerra, amb bacteris interaccionant. **B**, **C** i **D**, a la superfície externa de la paret cel.lular vegetal (p) s'observen estructures granulars electrodenses (fletxes), properes als bacteris (X 10000, X 40000 i, X25000, respectivament).

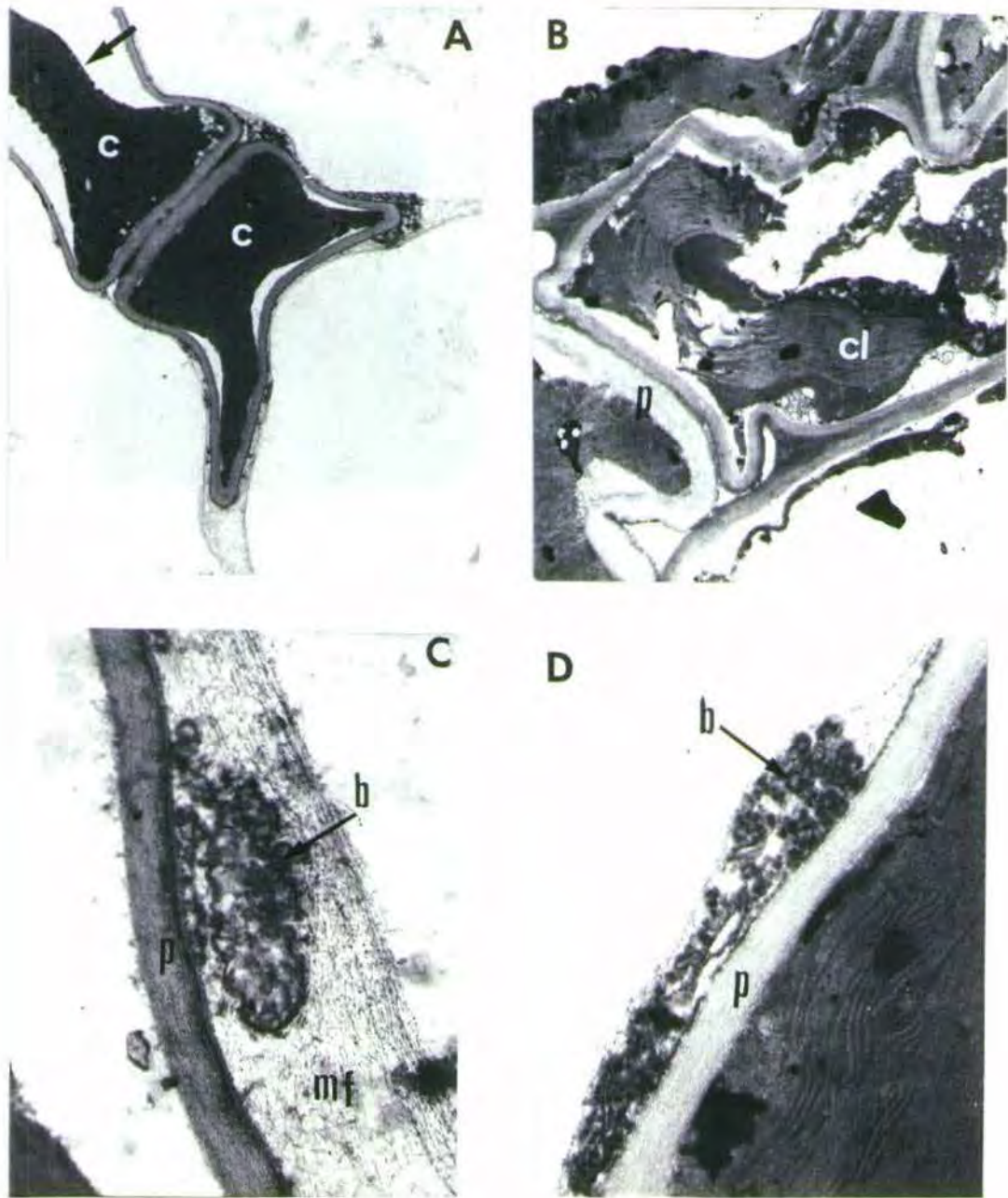


**Figura 2.16.** Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulles de plantes de perera tractades amb fosfonat potàssic infiltrades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Observi's la presència de bacteris (b) en l'espai intercel.lular (\*) propers a la superfície externa de les cèl.lules parenquimàtiques (v). No s'observen estructures granulars electrodenses al voltant dels bacteris. Les cèl.lules vegetals mantenen la seva estructura i organització interna, amb els cloroplasts (c) limitats per la membrana externa (fletxa). Tot i això en algunes cèl.lules parenquimàtiques (B i D) s'observa material fibril.lar en la cara interna de la paret cel.lular vegetal. A i B, X 6300; C, X 31500 i D, X 40000.



**Figura 2.17.** Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulles de plantes de perera tractades amb etefon infiltrades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. **Superior**, observi's la presència de bacteris (b) formant agregats en l'espai intercel.lular, limitats per la paret (p) de les cèl.lules parenquimàtiques i envoltats per material cel.lular procedent de cèl.lules vegetals que han abocat el contingut a l'espai intercel.lular (X 23100). **Inferior esquerra**, desorganització dels cloroplasts de les cèl.lules vegetals de la zona infiltrada amb bacteris (g= grana, m= midó) (X 16000). **Inferior dreta**, engruiximent de la paret cel.lular (p, cap de fletxa) de les cèl.lules parenquimàtiques al voltant dels bacteris (b) (X 20000).



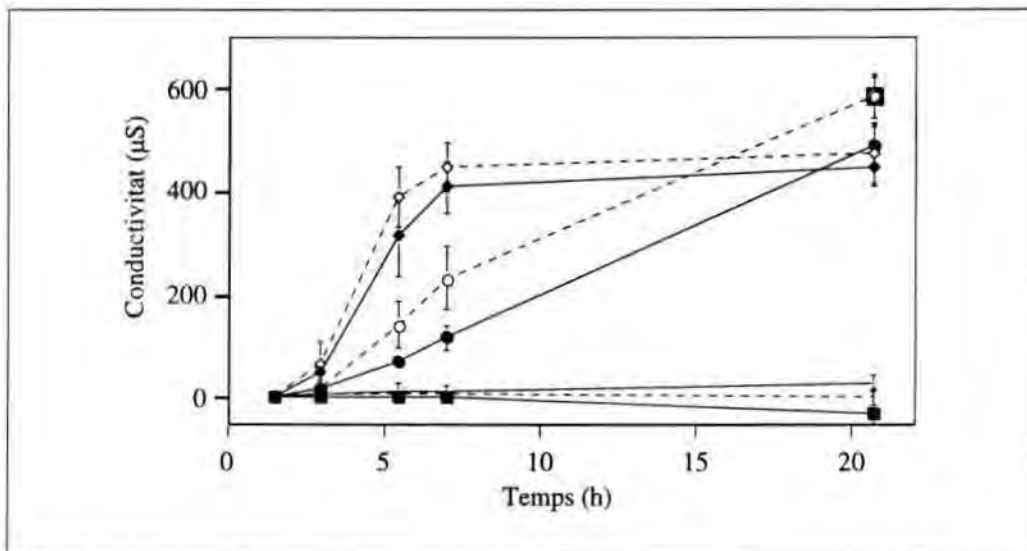


**Figura 2.18.** Microelectrografies al microscopi electrònic de transmissió de talls ultrafins de fulles de plantes de perera tractades amb fosfomicina infiltrades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. **A i B**, les cèl.lules parenquimàtiques de la zona infiltrada han perdut l'organització (citoplasma més electrodens, cl=cloroplasts) i la turgència, ja que el plasmalemma s'ha separat de la paret cel.lular (fletxa) (X 6300 i X 12500, respectivament). **B i C**, les cèl.lules bacterianes (b) es localitzen en la superfície externa de la paret cel.lular vegetal (p), envoltades per material fibril.lar (mf). S'observa la pèrdua de la integritat de la cèl.lula bacteriana (X 40000).

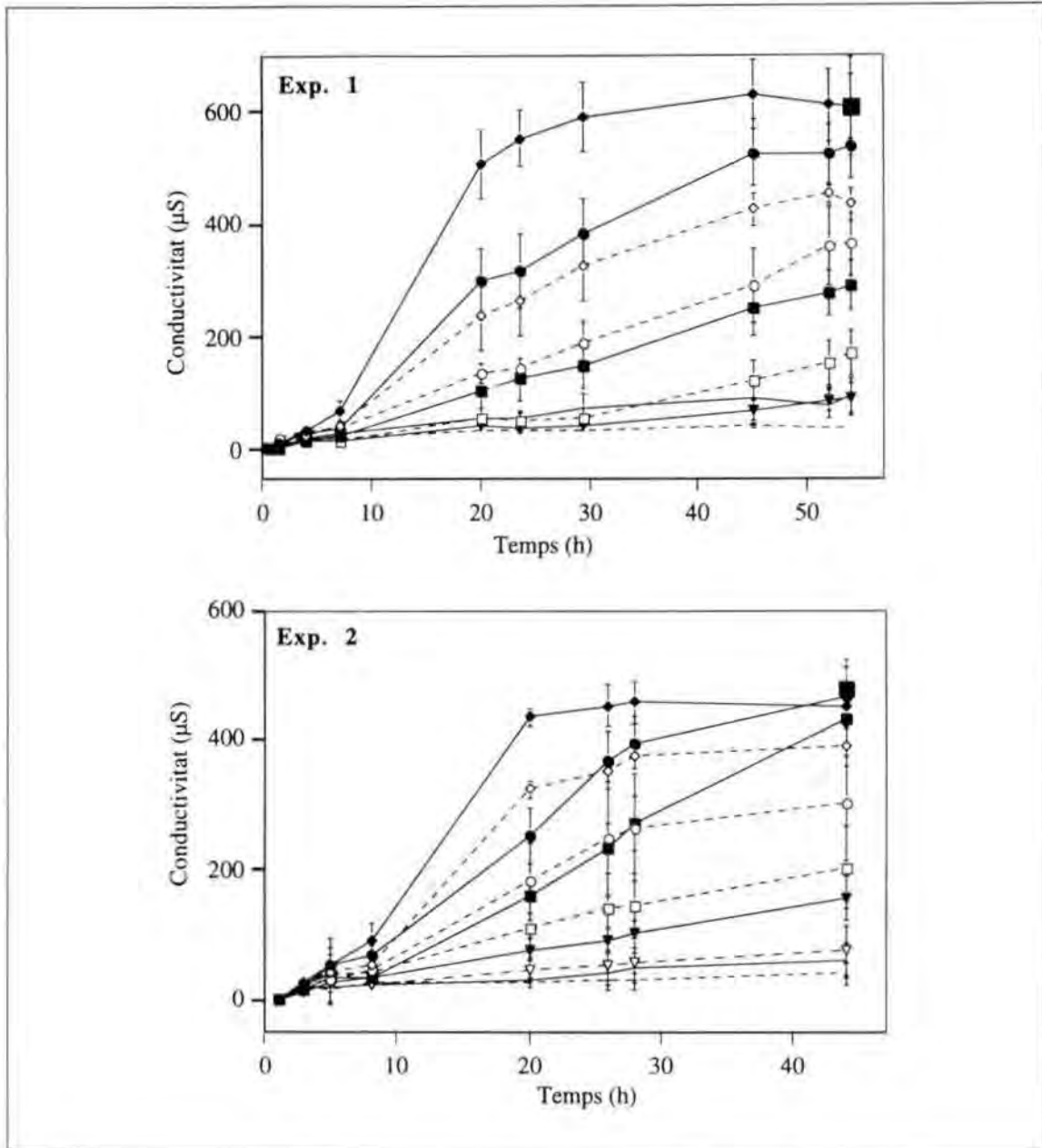
#### 4. Efecte dels fosfonats en la permeabilitat cel·lular dels teixits de la planta durant la interacció amb el patògen

A les Figures 2.19 a 2.22 es representa l'evolució de la conductivitat al llarg del temps en les solucions amb els discs de fulla de plantes de tabac, perera i mongetera, en funció del tractament amb fosfonats i del bacteri infiltrat. Els valors inicials de conductivitat van ser similars en tots els tractaments i superiors a 0 (100 a 200  $\mu\text{S}$ ). Per això, els valors de conductivitat representats en els gràfics i utilitzats en tots els càlculs estadístics corresponen a l'increment de conductivitat respecte la conductivitat a l'inici de la incubació. La durada de la incubació va ser diferent dependent de l'experiment (entre 24 i 72 h), en funció de la velocitat de sortida d'electròlits i el temps d'estabilització de la conductivitat en la solució d'incubació.

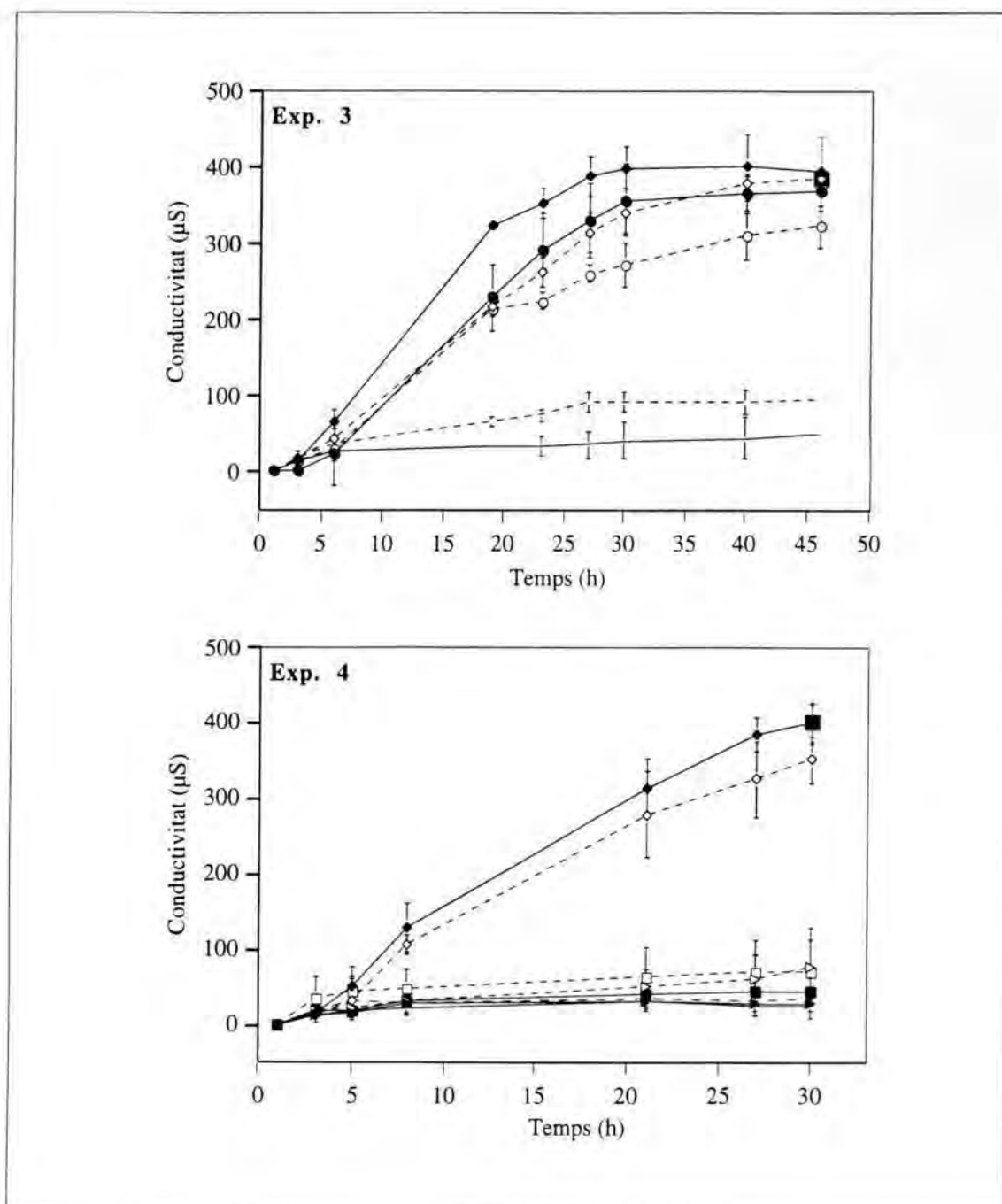
El nombre de bacteris infiltrats per disc de fulla en cada experiment va ser d'entre  $5 \times 10^6$  i  $1 \times 10^7$  ufc disc<sup>-1</sup>.



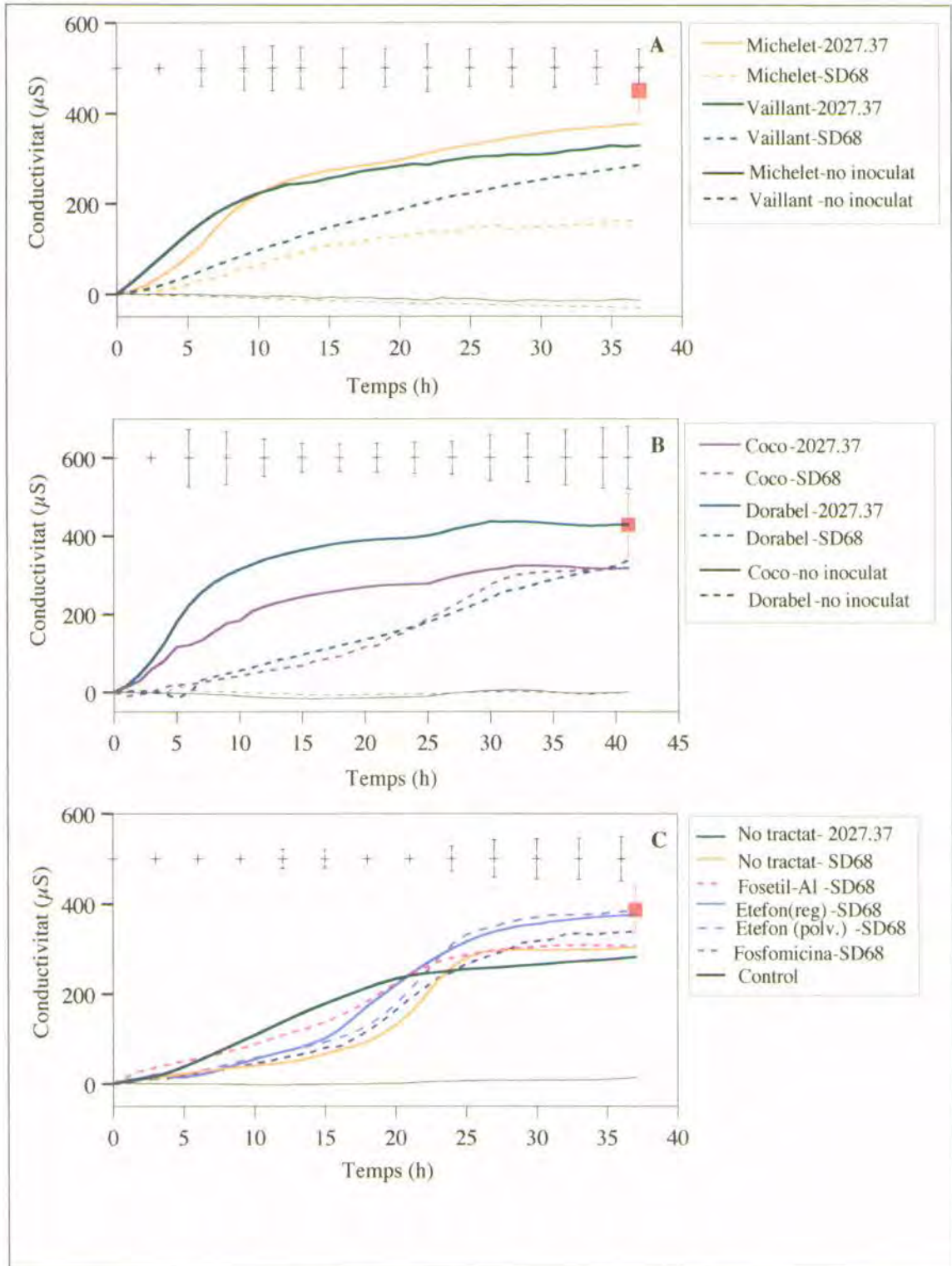
**Figura 2.19.** Efecte del tipus de bacteri i del tractament amb fosetil-Al en la sortida d'electròlits en discs de fulles de plantes de tabac de la varietat Xanthi. Plantes tractades amb fosetil-Al (línia discontinuïta, símbols blancs) i no tractades (línia contínua, símbols negres) es van infiltrar amb *P. syringae* pv. *tabaci* 2106 (compatible, ○, ●), *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37 (incompatible ◊, ◆) o *P. fluorescens* 88.1 (sapròfit ◻). Les incubacions es van efectuar en amortidor MES 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM (5 discs de fulla en 10 ml d'amortidor per repetició) a 25°C amb llum i agitació. Com a control es van utilitzar discs de fulla no inoculats (línies sense símbol). Cada valor correspon a la mitjana de la conductivitat de quatre repeticions. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitjana. Amb un quadrat gris es representa la conductivitat màxima observada.



**Figura 2.20.** Efecte del tipus de bacteri infiltrat i del tractament amb fosetil-Al en la sortida d'electròlits en discs de fulles de plantes de perera de la varietat Passe Crassane. Les plantes es van polvoritzar fins caiguda de gota amb solucions de fosetil-Al a la dosi d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}$   $\text{ml}^{-1}$ . Discs de fulles de plantes tractades amb fosetil-Al (línia discontinua, símbols blancs) i no tractades (línia contínua, símbols negres) es van infiltrar amb suspensions de *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37 (compatible, virulenta ◊, ◆), *P. syringae* pv. *syringae* 2831 (avirulenta ◻, ◼), *P. syringae* pv. *tabaci* 2106 (incompatible ○, ●) o *P. fluorescens* 88.1 (sapròfit ▽, ▼). Els discs infiltrats es van incubar en amortidor MES 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM (5 discs de fulles en 10 ml d'amortidor) durant 48 h a 25 °C, llum i agitació. Com a control es van utilitzar discs de fulla no infiltrats amb els bacteris (línies sense símbol). Per cada tractament es van realitzar quatre repeticions. L'experiment es va repetir dues vegades (Exps 1 i 2). Cada valor correspon a la mitjana de quatre repeticions per tractament. Les barres indiquen l'error estàndard de la mitjana. Amb un quadrat gris es representa la conductivitat màxima observada.



**Figura 2.21.** Efecte del tipus de bacteri infiltrat i del tractament amb foseetil-Al en la sortida d'electròlits en discs de fulles de plantes de perera de la varietat Passe Crassane. Es van realitzar els mateixos tractaments amb foseetil-Al descrits a la Figura 2.20. Discs de fulles de plantes tractades amb foseetil-Al (línia discontínua i símbols blancs) i no tractades (línia contínua i símbols negres) es van infiltrar amb suspensions d'*E. amylovora* 1430 (compatible virulenta ◊, ◆), els mutants avirulents *E. amylovora* 6070 (□, ■) i *E. amylovora* 6046 (▷, ►), o *P. syringae* pv. *tabaci* 2106 (incompatible ○, ●). Els discs infiltrats es van incubar en amortidor MES 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM (5 discs de fulles en 10 ml d'amortidor) durant 48 h a 25 °C, llum i agitació. Com a control es van utilitzar discs de fulla no infiltrats amb els bacteris (línies sense símbol). Per cada tractament es van realitzar quatre repeticions. Cada valor correspon a la mitjana de quatre repeticions per tractament. Les barres indiquen l'error estàndard de la mitjana. Amb un quadrat gris es representa la conductivitat màxima observada.



**Figura 2.22. A i B,** Efecte de la varietat de mongetera i el tipus de bacteri en la sortida d'electròlits en discs de fulles de les varietats Michelet, Vaillant, Coco i Dorabel. Es van infiltrar discs de fulla de les diferents varietats amb *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37 (incompatible) i *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 (compatible). **C,** Efecte del tractament amb fosfonats en la sortida d'electròlits en discs de fulles de plantes de mongetera de la varietat Michelet tractades amb foseetil-Al, etefon o fosfomicina, i infiltrats amb *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68. En tots els experiments es va mesurar la conductivitat cada hora durant la incubació dels discs en amortidor MES 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM (5 discs en 10 ml d'amortidor) a 25°C, llum i agitació. Els valors corresponen a la mitjana de les repeticions de cada tractament. Les barres indiquen l'error estàndard de la mitjana. En vermell es representa la conductivitat màxima de cada experiment.

### **Tabac**

En la situació compatible (*P. syringae* pv. *tabaci* 2106) es va produir un augment de la permeabilitat cel·lular lent i progressiu al llarg de la incubació, assolint els valors màxims de conductivitat al final d'aquesta. La infiltració de la soca incompatible (*P. syringae* pv. *syringae* 2027.37) va provocar un ràpid i fort augment de la permeabilitat cel·lular. A les 8 hores d'incubació es van assolir valors de conductivitat elevats i asimptòtics (Figura 2.19). En cada situació compatible/incompatible, la pauta de sortida d'electròlits de les cèl·lules vegetals va ser similar tant en les plantes tractades amb fosetil-Al com en les no tractades. Tot i això, a partir de les 5 hores d'incubació, la conductivitat de les suspensions dels discs de plantes tractades amb fosetil-Al va ser superior a la dels discs de plantes no tractades, en les dues situacions compatible i incompatible. En els discs de fulla infiltrats amb l'espècie sapròfita (*P. fluorescens* 88.1) no es van observar canvis en la permeabilitat cel·lular i els valors de conductivitat van ser similars als dels discs no infiltrats amb bacteris.

### **Perera**

En la situació compatible (*P. syringae* pv. *syringae* 2027.37) en les plantes no tractades amb fosetil-Al, es va produir una ràpida i forta permeabilització cel·lular. A les 20 hores d'incubació es van assolir valors de conductivitat elevats i asimptòtics (Figura 2.20). La mateixa situació en discs de plantes tractades amb fosetil-Al va provocar una permeabilització cel·lular lenta i progressiva. Al llarg de tota la incubació la conductivitat en les suspensions dels discs de plantes tractades amb fosfonats va ser inferior a la dels no tractats.

En la situació incompatible (*P. syringae* pv. *tabaci* 2106) es va observar un augment de la permeabilitat cel·lular lent i progressiu al llarg de la incubació. Al final de la incubació però, es van assolir valors de conductivitat elevats i similars als de la situació compatible (Figura 2.20). En les suspensions dels discs de plantes tractades amb fosetil-Al infiltrats amb *P. syringae* pv. *tabaci* 2106 es van obtenir valors de conductivitat inferiors als de les plantes no tractades durant tota la incubació.

La soca patògena avirulenta (*P. syringae* pv. *syringae* 2831) va produir un augment lent i gradual de la permeabilitat cel·lular en els discs de plantes no tractades amb fosetil-Al. Al final de la incubació però, la conductivitat va ser inferior a la de les anteriors

situacions. En els discs de plantes tractades amb fasetil-Al els valors de conductivitat van ser similars als dels discs no infiltrats amb bacteris. La infiltració de *P. fluorescens* 88.1 (sapròfit, no patògen) no va provocar canvis en la permeabilitat cel·lular, obtenint-se valors de conductivitat similars als de les solucions amb discs no infiltrats amb bacteris.

En els discs no tractats amb fasetil-Al i infiltrats amb *E. amylovora* 1430 (patògena i virulenta en perera) es va observar un fort i ràpid augment de la conductivitat (Figura 2.21). A les 25-30 hores d'incubació es van assolir els valors màxims de conductivitat. En els discs tractats amb fasetil-Al i infiltrats amb la mateixa soca la permeabilització cel·lular també va ser ràpida i forta, però la conductivitat va ser inferior en les 30 primeres hores d'incubació. Al final de la incubació però, les conductivitats es van igualar en els dos tractaments. La pauta de sortida d'electròlits dels discs tractats amb fasetil-Al en la situació compatible, va ser similar a la dels discs de plantes no tractades en la situació incompatible. La infiltració de les soques d'*E. amylovora* mutants no virulents (6046 i 6070) no va provocar canvis en la permeabilitat cel·lular, amb valors de conductivitat estables al llarg de la incubació i similars als dels discs no infiltrats amb bacteris.

### ***Mongetera***

En mongetera, la infiltració de *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 (situació compatible) va provocar una permeabilització cel·lular lenta i progressiva en totes les varietats. En la situació incompatible (infiltració de *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37) en canvi, es va produir un augment fort i ràpid de la permeabilitat cel·lular, obtenint a les 15-20 hores d'incubació valors de conductivitat elevats i asimptòtics (Figura 2.22 A i B). Al final de la incubació, els valors de conductivitat en la situació compatible van ser similars als de la incompatible per les varietats Michelet, Coco (sensibles al patògen) i Dorabel (resistent), i inferiors en la varietat Vaillant (resistent).

El tractament de les plantes de mongetera de la varietat Michelet amb diferents fosfonats va provocar modificacions en la permeabilitat cel·lular (Figura 2.22 C). En els discs de fulles de plantes tractades amb etefon o amb fosfomicina i infiltrats amb la soca patògena (*P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68), la pauta de sortida d'electròlits al llarg del temps va ser similar a la dels discs no tractats amb fosfonats i també infiltrats amb el patògen. En els discs de fulles de plantes tractades amb fasetil-Al la permeabilització va ser similar a la dels discs no tractats amb fosfonats i infiltrats amb *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37 (situació incompatible).

#### 4.1. Efecte del tipus d'interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en la pèrdua final d'electròlits dels teixits de la planta

Els valors de conductivitat al final de la incubació de les solucions amb els discs infiltrats en cada un dels experiments van mostrar les variàncies homogènies d'acord amb la prova de Bartlett ( $(P>F)>0.05$ ) i els residus es van distribuir de forma normal ( $W>0.80$ ,  $(P<W)>0.05$ ) segons la prova de Shapiro-Wilk. L'anàlisi de la variància va mostrar un efecte significatiu del tractament (combinació bacteri-planta i/o tractament amb fosfonats) en la conductivitat de la solució al final de la incubació, en tots els experiments ( $(P>F)<0.001$ ,  $R^2>0.90$ ).

A les Taules 2.14 i 2.15 es presenten els resultats de la prova de separació de mitjanes realitzada per comparar l'efecte dels tractaments en la pèrdua final d'electròlits de les suspensions de discs foliars.

En tabac, en la situació compatible en plantes tractades amb fosetil-Al es van obtenir valors de conductivitat final significativament superiors als de la resta de tractaments. En la situació incompatible no es van observar diferències en la capacitat final de pèrdua d'electròlits en funció del tractament de les plantes amb fosetil-Al, ni respecte la situació compatible en plantes no tractades (Taula 2.14).

En les infiltracions de *P. syringae* en perera, la pèrdua final d'electròlits va ser significativament superior en les plantes no tractades amb fosetil-Al respecte les tractades, en cada combinació bacteri-planta (Taula 2.14). Tot i això, en la situació compatible (experiment 2) no es van observar diferències significatives en la conductivitat al final de la incubació en funció del tractament amb fosetil-Al. En cap dels experiments es van observar diferències en la conductivitat al final de la incubació dels discs infiltrats amb el bacteri sapròfit (*P. fluorescens* 88.1) i dels discs no infiltrats amb bacteris.

En les inoculacions d'*E. amylovora* 1430 en perera (situació compatible) no es van observar diferències en la pèrdua final d'electròlits en funció del tractament amb fosetil-Al. En els discs infiltrats amb les soques mutants no virulentes d'*E. amylovora* la conductivitat al final de la incubació va ser baixa i significativament inferior a la resta de tractaments.



**Taula 2.14.** Efecte del tipus de bacteri infiltrat i del tractament amb fosetil-Al en la sortida d'electròlits de discs de fulla de plantes de tabac i perera

Planta	Espècie bacteriana <sup>v</sup>	Tractament amb fosetil-Al <sup>x</sup>	Conductivitat final <sup>z</sup> (µS)			
			Exp.1	Exp.2		
Tabac	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	No	489	b		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	Si	582	a		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	448	b		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	Si	475	b		
	<i>P. fluorescens</i> 88.1	Si	-27	c		
	Control no inoculat	No	-19	c		
	Control no inoculat	Si	-8	c		
Perera (Exps. 1 i 2)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	607	a		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	Si	433	bc		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	No	535	ab		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	Si	361	cd		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831	No	289	de		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831	Si	169	ef		
	<i>P. fluorescens</i> 88.1	No		154	de	
	<i>P. fluorescens</i> 88.1	Si	92	g	74	e
	Control no inoculat	No	92	fg	60	e
Control no inoculat	Si	37	g	38	e	
Perera (Exp. 3)	<i>E. amylovora</i> 1430	No	393	a		
	<i>E. amylovora</i> 1430	Si	385	a		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	No	369	ab		
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	Si	322	b		
	Control no inoculat	No	48	c		
Control no inoculat	Si	95	c			
Perera (Exp. 4)	<i>E. amylovora</i> 1430	No	350	a		
	<i>E. amylovora</i> 1430	Si	398	a		
	<i>E. amylovora</i> 6046	No	29	b		
	<i>E. amylovora</i> 6046	Si	75	b		
	<i>E. amylovora</i> 6070	No	45	b		
	<i>E. amylovora</i> 6070	Si	71	b		
	Control no inoculat	No	26	b		
Control no inoculat	Si	32	b			

<sup>v</sup> Es van inocular discs de fulles de plantes de perera i tabac per infiltració amb suspensions d'1 x 10<sup>9</sup> ufc ml<sup>-1</sup> de les diferents soques bacterianes. Per cada tractament es van realitzar quatre repeticions amb 5 discs de fulla per repetició. Els 5 discs de fulla de cada repetició es van col·locar en tubs amb 10 ml d'amortidor MES 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM i es van incubar durant 2-3 dies a 25°C amb llum i en agitació

<sup>x</sup> Les plantes es van tractar diàriament durant els quatre dies previs a les infiltracions i el mateix dia de les infiltracions per polvorització fins caiguda de gota en totes les fulles, per l'anvers i el revers, amb solucions en aigua destil·lada d'1.86 g HPO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> de fosetil-Al

<sup>z</sup> Es va mesurar la conductivitat de les solucions d'incubació dels discs al final de la incubació (24 h en tabac, 30-70 h en perera). Els valors corresponen a la mitjana de quatre repeticions per tractament. Valors de conductivitat, en un mateix experiment, seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives d'acord amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer (P=0.05)

**Taula 2.15.** Efecte del tipus de bacteri infiltrat i del tractament amb fosfonats en la sortida d'electròlits de discs de fulles de diferents varietats de mongetera

<i>Varietat de mongetera</i>	<i>Espècie bacteriana</i> <sup>y</sup>	<i>Tractament amb fosfonats</i> <sup>x</sup>	<i>Conductivitat final</i> <sup>z</sup> (µS)
<i>(Exp. 1)</i>			
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	284 a
Vaillant	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	158 b
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	320 a
Vaillant	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	375 a
Michelet	Control no inoculat	No	-14 c
Vaillant	Control no inoculat	No	-31 c
<i>(Exp. 2)</i>			
Coco	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	318 a
Dorabel	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	336 a
Coco	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	316 a
Dorabel	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	428 a
Coco	Control no inoculat	No	0 b
Dorabel	Control no inoculat	No	-1 b
<i>(Exp. 3)</i>			
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	282 a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	303 a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Fosetil-Al	306 a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Etefon (reg.)	386 a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Etefon (polv.)	376 a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Fosfomicina	338 a
Michelet	Control no inoculat	No	14 b

<sup>y</sup> Es van inocular discs de fulles de plantes de mongetera per infiltració amb suspensions d' $1 \times 10^9$  ufc ml<sup>-1</sup> de les diferents soques bacterianes. Per cada tractament es van realitzar tres repeticions (Exps. 1 i 2) i dos repeticions (Exp. 3) amb 5 discs de fulla per repetició. Els 5 disc de fulla infiltrats de cada repetició es van col·locar en tubs amb 10 ml d'amortidor MES 0.5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM i es van incubar durant 2 dies a 25°C amb llum i en agitació

<sup>x</sup> Les plantes es van tractar amb solucions en aigua destil·lada d'1.86 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup> de fosetil-Al, etefon i fosfomicina. El fosetil-Al es va aplicar regant les plantes els dos dies previs a les inoculacions amb 100 ml de la solució i per polvorització foliar fins caiguda de gota el mateix dia de les inoculacions. La fosfomicina es va aplicar per polvorització foliar fins caiguda de gota els dos dies anteriors a les inoculacions i el mateix dia de les inoculacions i l'etefon es va aplicar de les dues formes, una com el fosetil-Al (etefon reg.) i l'altra com la fosfomicina (etefon polv.)

<sup>z</sup> Es va mesurar la conductivitat de les solucions d'incubació dels discs al final de la incubació (35-40 hores). Els valors corresponen a la mitjana de les repeticions de cada tractament. En un mateix experiment valors de conductivitat seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives d'acord amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ )

En mongetera, en les infiltracions realitzades en les varietats Coco i Dorabel no es van observar diferències en la capacitat final de pèrdua d'electròlits entre varietats ni entre bacteris inoculats (situació compatible/incompatible). En la interacció *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68/Vaillant (resistent) la conductivitat final va ser significativament inferior a la dels discs de la varietat Michelet (sensible) i a la de la interacció incompatible (*P. syringae* pv. *syringae* 2027.37) per les dues varietats (Taula 2.15). En els discs de fulles de la varietat Michelet tractades amb els fosfonats no es van observar diferències en la conductivitat final entre productes ni amb les plantes no tractades.

#### **4.2. Efecte dels fosfonats en la cinètica de sortida d'electròlits en discs de fulla infiltrats amb bacteris**

A partir dels valors de conductivitat al llarg del temps corresponents a cada tractament i repetició, es van obtenir per regressió no lineal amb l'equació 5 (pàg. 52), els paràmetres que defineixen la taxa de sortida d'electròlits dels discs foliars ( $K_0$  i  $b$ ).

##### **4.2.1. Determinació de la conductivitat màxima en cada experiment**

Per cada un dels experiments es va determinar la conductivitat màxima ( $C_{max}$ ), després d'haver sotmès les mostres, al final de la incubació, a un tractament de congelació i descongelació (pàg. 52). Els valors de conductivitat màxima dels diferents tractaments i experiments van ser molt heterogenis. En alguns experiments (en tabac, en l'experiment 4 en perera i els experiments 2 i 3 en mongetera) no es van poder utilitzar les mesures de conductivitat màxima després del tractament de congelació-descongelació, degut a la inestabilitat dels valors de conductivitat de la solució. En conseqüència es va utilitzar com a conductivitat màxima la conductivitat al final de l'experiment significativament superior a la resta de tractaments, segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer (Taulas 2.14 i 2.15). En els experiments en que es va mesurar experimentalment la conductivitat màxima (Exps. 1, 2, i 3 en perera, i Exp. 1 en mongetera) es va realitzar la prova de separació de mitjanes per comparar els valors de conductivitat màxima dels diferents tractaments. En cada experiment, les variàncies dels valors de conductivitat màxima dels diferents tractaments van ser homogènies segons la prova de Bartlett ( $P>0.05$ ) i els residus es van distribuir normalment ( $W>0.80$ ,  $(P<W)>0.05$ ) segons la prova de Shapiro-Wilk. En cas d'observar diferències significatives entre tractaments en la conductivitat màxima (experiments 1, 2 i 3 en perera), es va utilitzar la conductivitat del

tractament amb valors significativament superiors. En l'experiment 3 en mongetera es va utilitzar la conductivitat mitjana de tots els tractaments, en no observar-se diferències significatives entre tractaments en la conductivitat màxima. A les Figures 2.19 a 2.22 es representa el valor de conductivitat màxima utilitzat per a l'obtenció dels paràmetres del model i pel càlcul del temps de pèrdua mitjana d'electròlits ( $t_{50}$ ).

#### 4.2.2. Determinació dels paràmetres cinètics i bondat de l'ajust al model monomolecular

A les Taules 2.16 a 2.21 es mostren els valors dels paràmetres  $K_0$  i  $b$  de l'equació 5 (pàg. 52) per cada una de les repeticions dels diferents tractaments (excepte pels controls no inoculats). En tots els experiments el model monomolecular amb taxa de sortida d'electròlits variable en el temps es va ajustar adequadament a les dades de sortida d'electròlits al llarg del temps.

**Taula 2.16.** Paràmetres i ajust de l'equació 5 (pàg. 52) als valors de conductivitat al llarg del temps en discs de fulles de plantes de tabac infiltrats amb bacteris

Tractament <sup>a</sup>	Repetició	Paràmetres		$R^2$	$P>F$	Residus	
		$K_0$	$b$			$W$	$P<W$
nt-2106	1	0.0054	-0.0070	0.99	0.0002	0.8650	0.2438
nt-2106	2 *	-0.0149	-0.0128	0.99	0.0001	0.7750	0.0517
nt-2106	3	0.0041	-0.0070	0.99	0.0000	0.9532	0.7655
nt-2106	4	0.0053	-0.0075	0.99	0.0002	0.8411	0.1651
Al-2106	1	-0.0320	-0.0360	0.99	0.0001	0.8750	0.2848
Al-2106	2	-0.0320	-0.0310	0.99	0.0000	0.8889	0.3497
Al-2106	3	-0.0315	-0.0220	0.99	0.0001	0.8334	0.1449
Al-2106	4	-0.0440	-0.0350	0.99	0.0002	0.8520	0.1979
nt-2027.37	1	0.0941	0.0034	0.86	0.0022	0.9031	0.4244
nt-2027.37	2 *	-0.0650	-0.0820	0.95	0.0045	0.7474	0.0301
nt-2027.37	3	0.1348	0.0033	0.80	0.0046	0.8652	0.2446
nt-2027.37	4	0.1092	0.0027	0.82	0.0342	0.8649	0.2438
Al-2027.37	1 *	0.1478	0.0081	0.86	0.0251	0.9181	0.5199
Al-2027.37	2 *	0.1276	0.0046	0.87	0.0303	0.8792	0.3030
Al-2027.37	3	-0.0934	-0.0884	0.97	0.0013	0.9175	0.5165
Al-2027.37	4	-0.1203	-0.1414	0.99	0.0005	0.8950	0.3856

<sup>a</sup> Tractament de les plantes amb fasetil-Al (nt: no tractades; Al: tractades) i bacteri inoculat (*P. syringae* pv. *phaseolicola* 2106 i *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37). Per cada repetició i tractament es van obtenir, per regressió no lineal, els paràmetres  $K_0$  i  $b$  de l'equació i es va calcular el coeficient de determinació ( $R^2$ ), el grau de significació ( $P>F$ ) i la normalitat dels residus (prova de Shapiro-Wilk)

\* Repeticions no utilitzades en càlculs estadístics posteriors degut a que alguns dels paràmetres presentaven valors diferents a la resta de repeticions del tractament i donaven variàncies no homogènies o residus en el límit de la significació

**Taula 2.17.** Paràmetres i ajust de l'equació 5 (pàg. 52) als valors de conductivitat al llarg del temps en discs de fulles de plantes de perera en funció del bacteri infiltrat i del tractament amb fosfonats (experiment 1)

Tractament <sup>a</sup>	Repetició	Paràmetres		$R^2$	$P>F$	Residus	
		$K_0$	$b$			$W$	$P<W$
nt-2027.37	1	0.0077	-0.0042	0.98	0.0000	0.8468	0.0515
nt-2027.37	2*	-0.0050	-0.0095	0.98	0.0000	0.7505	0.0040
nt-2027.37	3	-0.0150	-0.0087	0.99	0.0000	0.9626	0.8036
nt-2027.37	4	-0.0340	-0.0180	0.98	0.0000	0.8391	0.0419
AI-2027.37	1	0.0180	-0.0002	0.99	0.0000	0.8526	0.0602
AI-2027.37	2	0.0250	-0.0001	0.98	0.0000	0.8511	0.0578
AI-2027.37	3	0.0090	-0.0006	0.99	0.0000	0.9541	0.7028
AI-2027.37	4	0.0290	-0.0001	0.98	0.0000	0.9839	0.9804
nt-2106	1	0.0290	0.0001	0.97	0.0000	0.9318	0.4949
nt-2106	2	0.0028	-0.001	0.99	0.0000	0.9350	0.4828
nt-2106	3	0.0065	-0.0041	0.98	0.0000	0.9156	0.3085
nt-2106	4	0.0220	-0.0012	0.98	0.0000	0.9212	0.3526
AI-2106	1	0.0062	-0.0003	0.99	0.0000	0.9823	0.9734
AI-2106	2	0.0057	-0.0003	0.98	0.0000	0.9336	0.4679
AI-2106	3	0.0096	-0.0002	0.99	0.0000	0.9455	0.5992
AI-2106	4	0.0104	-0.0001	0.99	0.0000	0.9700	0.8973
nt-2831	1	0.0108	-0.0002	0.99	0.0000	0.9295	0.4272
nt-2831	2	0.0094	-0.0001	0.99	0.0000	0.9534	0.6944
nt-2831	3	0.0058	-0.0002	0.99	0.0000	0.9656	0.8368
nt-2831	4	0.0033	-0.0002	0.099	0.0000	0.9064	0.2459
AI-2831	1	0.0014	-0.0001	0.95	0.0000	0.9302	0.4348
AI-2831	2	0.0020	-0.0001	0.98	0.0000	0.9154	0.3102
AI-2831	3	0.0055	-0.0001	0.99	0.0000	0.9338	0.4697
AI-88.1	1	0.0022	-0.0001	0.98	0.0000	0.9816	0.9697
AI-88.1	2	0.0015	-0.0001	0.95	0.0000	0.9484	0.6336
AI-88.1	3	0.0033	-0.0001	0.95	0.0000	0.9448	0.5912
AI-88.1	4	0.0046	-0.0001	0.93	0.0000	0.9811	0.9675

<sup>a</sup> Tractament de les plantes amb fosetil-AI (nt: no tractades; AI: tractades) i bacteri infiltrat (*P. syringae* pv. *syringae* 2027.37, *P. syringae* pv. *tabaci* 2106, *P. syringae* pv. *syringae* 2831 i *P. fluorescens* 88.1)

Per cada tractament i repetició es van obtenir, per regressió no lineal, els paràmetres  $K_0$  i  $b$  i es va calcular el coeficient de determinació ( $R^2$ ), el grau de significació ( $P>F$ ) i la normalitat dels residus (prova de Shapiro-Wilk). Amb un \* s'indiquen les repeticions no utilitzades en càlculs posteriors degut a la distribució no normal dels residus

**Taula 2.18.** Paràmetres i ajust de l'equació 5 (pàg. 52) als valors de conductivitat al llarg del temps en discs de fulles de plantes de perera en funció del bacteri infiltrat i del tractament amb fosfonats (experiment 2)

Tractament <sup>a</sup>	Repetició	Paràmetres		$R^2$	$P>F$	Residus	
		$K_0$	$b$			$W$	$P<W$
nt-2027.37	1	-0.0340	-0.0170	0.98	0.0000	0.7175	0.0400
nt-2027.37	2	-0.0240	-0.0140	0.99	0.0000	0.8865	0.1422
nt-2027.37	3	-0.0180	-0.0170	0.99	0.0000	0.8081	0.0863
nt-2027.37	4	-0.0127	-0.0157	0.99	0.0000	0.8496	0.0966
Al-2027.37	1	-0.0002	-0.0058	0.98	0.0000	0.9293	0.5142
Al-2027.37	2	0.0033	-0.0051	0.97	0.0000	0.9632	0.5148
Al-2027.37	3	0.0008	-0.0053	0.99	0.0000	0.9817	0.9668
Al-2027.37	4	0.0026	-0.0062	0.99	0.0000	0.9647	0.8520
nt-2106	1	0.0150	-0.0026	0.98	0.0000	0.8038	0.0838
nt-2106	2	-0.0089	-0.0070	0.98	0.0000	0.8714	0.1586
nt-2106	3	0.0059	-0.0040	0.99	0.0000	0.9231	0.4608
nt-2106	4	-0.0018	-0.0069	0.99	0.0000	0.9901	0.9930
Al-2106	1	0.0126	-0.0001	0.95	0.0000	0.8663	0.1415
Al-2106	2	0.0216	-0.0005	0.98	0.0000	0.9756	0.9344
Al-2106	3	0.0087	-0.0024	0.98	0.0000	0.9772	0.9438
Al-2106	4	0.0147	-0.0025	0.97	0.0000	0.9507	0.7209
nt-2831	1	-0.0007	-0.0025	0.98	0.0000	0.9525	0.7385
nt-2831	2	-0.0062	-0.0037	0.97	0.0000	0.9682	0.8820
nt-2831	3	-0.0012	-0.0026	0.99	0.0000	0.9439	0.6538
nt-2831	4	0.0031	-0.0016	0.99	0.0000	0.9724	0.9132
Al-2831	1	0.0084	-0.0005	0.97	0.0000	0.9217	0.4495
Al-2831	2	0.0084	-0.0003	0.37	0.1108	0.7719	0.0151
Al-2831	3	0.0128	0.0001	0.99	0.0000	0.9621	0.8291
Al-2831	4	0.0094	0.0001	0.99	0.0000	0.9597	0.8071
nt-88.1	1	0.0055	-0.0002	0.98	0.0000	0.9064	0.3341
nt-88.1	2	0.0120	-0.0001	0.99	0.0000	0.8997	0.2919
nt-88.1	3	0.0077	-0.0001	0.99	0.0000	0.9578	0.7899
nt-88.1	4	0.0100	-0.0001	0.99	0.0000	0.9124	0.3759
Al-88.1	1	0.0067	0.0002	0.89	0.0000	0.9590	0.8011
Al-88.1	2	0.0034	0.0001	0.93	0.0000	0.9641	0.8471
Al-88.1	3 *	0.0108	0.0002	0.28	0.1774	0.7236	0.0047
Al-88.1	4	0.0088	0.0001	0.99	0.0000	0.9287	0.5090

<sup>a</sup> Tractament de les plantes amb fosetil-Al (nt: no tractades i Al: tractades) i bacteri infiltrat (*P. syringae* pv. *syringae* 2027.37, *P. syringae* pv. *tabaci* 2106, *P. syringae* pv. *syringae* 2831 i *P. fluorescens* 88.1)

Per cada tractament i repetició es van obtenir, per regressió no lineal, els paràmetres  $K_0$  i  $b$  i es va calcular el coeficient de determinació ( $R^2$ ), el grau de significació ( $P>F$ ) i la normalitat dels residus (prova de Shapiro-Wilk)

\* Repetició no considerada en càlculs estadístics posteriors pel baix ajust del model i la distribució no normal dels residus

**Taula 2.19.** Paràmetres i ajust de l'equació 5 (pàg. 52) als valors de conductivitat al llarg del temps en discs de fulles de plantes de perera en funció del bacteri infiltrat i del tractament amb fosfonats (experiments 3 i 4)

<i>Experiment 3</i>							
Tractament <sup>a</sup>	Repetició	Paràmetres		$R^2$	$P>F$	Residus	
		$K_0$	$b$			$W$	$P<W$
nt-1430	1	-0.0140	-0.0102	0.99	0.0000	0.9821	0.9711
nt-1430	2	0.0076	-0.0091	0.99	0.0000	0.9880	0.9928
nt-1430	3	0.0186	-0.0056	0.98	0.0000	0.7811	0.0130
nt-1430	4	-0.0033	-0.0090	0.99	0.0000	0.9658	0.8516
Al-1430	1	0.0129	-0.0027	0.99	0.0000	0.9455	0.6346
Al-1430	2	0.0083	-0.0030	0.99	0.0000	0.9845	0.4810
Al-1430	3	0.0027	-0.0049	0.99	0.0000	0.9602	0.7951
Al-1430	4	0.0087	-0.0033	0.99	0.0000	0.8921	0.2054
nt-2106	1	-0.0066	-0.0047	0.99	0.0000	0.9751	0.9305
nt-2106	2	-0.0160	-0.0095	0.99	0.0000	0.8747	0.1358
nt-2106	3	-0.0129	-0.0020	0.99	0.0000	0.9510	0.6950
nt-2106	4	-0.0094	-0.0057	0.99	0.0000	0.9594	0.7862
Al-2106	1	0.0160	-0.0007	0.99	0.0000	0.8489	0.0720
Al-2106	2	0.0340	-0.0002	0.97	0.0000	0.9214	0.3980
Al-2106	3 *	0.0086	-0.0004	0.99	0.0000	0.7573	0.0019
Al-2106	4	0.0333	-0.0001	0.97	0.0000	0.9484	0.6663

<i>Experiment 4</i>							
Tractament <sup>a</sup>	Repetició	Paràmetres		$R^2$	$P>F$	Residus	
		$K_0$	$b$			$W$	$P<W$
nt-1430	1	0.0177	-0.0018	0.99	0.0000	0.8785	0.2282
nt-1430	2	0.0106	-0.0044	0.99	0.0000	0.8805	0.2372
nt-1430	3	0.0167	-0.0036	0.99	0.0000	0.8617	0.1614
nt-1430	4	0.0001	-0.0096	0.99	0.0000	0.8906	0.2888
Al-1430	1	0.0182	-0.0069	0.99	0.0000	0.9891	0.9882
Al-1430	2	0.0059	-0.0057	0.99	0.0000	0.7992	0.0401
Al-1430	3	0.0124	-0.0052	0.99	0.0000	0.9238	0.5182
Al-1430	4	-0.0134	-0.0191	0.99	0.0000	0.9104	0.4147

<sup>a</sup> Tractament de les plantes amb fosetil-Al (nt: no tractades, Al: tractades) i bacteri infiltrat (*E. amylovora* 1430 i *P. syringae* pv. *tabaci* 2106)  
 Per cada tractament i repetició es van obtenir, per regressió no lineal, els paràmetres  $K_0$  i  $b$  i es va calcular el coeficient de determinació ( $R^2$ ), el grau de significació ( $P>F$ ) i la normalitat dels residus (prova de Shapiro-Wilk)  
 \* Repetició no considerada en càlculs estadístics posteriors per manca de normalitat en la distribució dels residus

**Taula 2.20.** Paràmetres i ajust de l'equació 5 (pàg. 52) als valors de conductivitat al llarg del temps en discs de fulles de plantes de diferents varietats de mongetera infiltrats amb diferents soques bacterianes (experiments 1 i 2)

<i>Experiment 1</i>							
Tractament <sup>a</sup>	Repetició	Paràmetres		$R^2$	$P>F$	Residus	
		$K_0$	$b$			$W$	$P<W$
Michelet-2027.37	1	0.0999	0.0034	0.99	0.0000	0.9227	0.0642
Michelet-2027.37	2	0.0749	0.0019	0.98	0.0000	0.9111	0.0560
Michelet-2027.37	3	0.0637	0.0011	0.99	0.0000	0.9534	0.1587
Michelet-SD68	1	0.0242	-0.0005	0.99	0.0000	0.9539	0.1648
Michelet-SD68	2	0.0276	-0.0003	0.99	0.0000	0.9005	0.0544
Michelet-SD68	3	0.0157	-0.0009	0.99	0.0000	0.9347	0.0537
Vaillant-2027.37	1	0.0680	0.0020	0.97	0.0000	0.9198	0.0811
Vaillant-2027.37	2	0.0450	-0.0021	0.98	0.0000	0.9588	0.2362
Vaillant-2027.37	3	0.0700	0.0012	0.98	0.0000	0.9080	0.0440
Vaillant-SD68	1	0.0110	0.0001	0.99	0.0000	0.9514	0.1360
Vaillant-SD68	2	0.0190	0.0001	0.98	0.0000	0.9538	0.1628
Vaillant-SD68	3	0.0300	0.0010	0.91	0.0000	0.9479	0.1048
<i>Experiment 2</i>							
Coco-2027.37	1	0.0770	0.00078	0.98	0.0000	0.9348	0.2530
Coco-2027.37	2	0.0580	-0.0009	0.99	0.0000	0.9640	0.2955
Coco-2027.37	3	0.0398	0.0001	0.95	0.0000	0.9660	0.3435
Coco-SD68	1	-0.0145	-0.0028	0.97	0.0000	0.9477	0.0787
Coco-SD68	2	-0.0024	-0.0038	0.98	0.0000	0.9662	0.3453
Coco-SD68	3	-0.0026	-0.0013	0.96	0.0000	0.9657	0.3334
Dorabel-2027.37	1	0.0510	-0.0058	0.99	0.0000	0.9508	0.1024
Dorabel-2027.37	2	0.0153	0.0055	0.96	0.0000	0.9486	0.0846
Dorabel-2027.37	3	0.0546	-0.0287	0.94	0.0000	0.9068	0.0211
Dorabel-SD68	1 *	-0.0065	-0.0029	0.97	0.0000	0.8800	0.0200
Dorabel-SD68	2 *	0.0092	-0.0008	0.80	0.0000	0.9452	0.0000
Dorabel-SD68	3 *	0.0078	-0.0009	0.97	0.0000	0.7231	0.0000

<sup>a</sup> Varietat de mongetera i bacteri infiltrat (*P. syringae* pv. *syringae* 2027.37 i *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68)

Per cada tractament i repetició es van obtenir, per regressió no lineal, els paràmetres  $K_0$  i  $b$  i es va calcular el coeficient de determinació ( $R^2$ ), el grau de significació ( $P>F$ ) i la normalitat dels residus (prova de Shapiro-Wilk)

\* Repeticions considerades en càlculs estadístics posteriors tenint en compte però, la manca de normalitat en la distribució dels residus



**Taula 2.21.** Paràmetres i ajust de l'equació 5 als valors de conductivitat al llarg del temps en discs de fulles de plantes de mongetera de la varietat Michelet en funció del bacteri infiltrat i del tractament amb fosfonats

Tractament <sup>a</sup>	Repetició	Paràmetres		$R^2$	$P>F$	Residus	
		$K_0$	$b$			$W$	$P<W$
nt-2027.37	1	0.0325	-0.0014	0.99	0.0000	0.8871	0.0900
nt-2027.37	2	0.0385	-0.0031	0.96	0.0000	0.8907	0.0110
nt-SD68	1	-0.0149	-0.0038	0.92	0.0000	0.9642	0.3408
nt-SD68	2	-0.0081	-0.0042	0.96	0.0000	0.9234	0.0149
Al-SD68	1	0.0009	-0.0037	0.99	0.0000	0.9116	0.0580
Al-SD68	2	0.0236	-0.0014	0.95	0.0000	0.9357	0.0398
Etf(reg.)-SD68	1	-0.0329	-0.0110	0.97	0.0000	0.8395	0.0110
Etf(reg.)-SD68	2	-0.0157	-0.0091	0.98	0.0000	0.8904	0.0111
Etf(pol.)-SD68	1	-0.0209	-0.0087	0.94	0.0000	0.8533	0.0112
Etf(pol.)-SD68	2	-0.0210	-0.0086	0.95	0.0000	0.9633	0.0322
Fm-SD68	1	-0.0187	-0.0056	0.97	0.0000	0.9700	0.4935
Fm-SD68	2	-0.0100	-0.0038	0.98	0.0000	0.9235	0.0510

<sup>a</sup> Tractament de les plantes amb fosfonats (nt: no tractades; Al: fosetil-Al, Etf(reg.): etefon per irrigació, Etf (pol.): etefon per polvorització, i Fm: fosfomicina), i bacteri infiltrat (*P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 i *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37)  
 Per cada tractament i repetició es van obtenir, per regressió no lineal, els paràmetres  $K_0$  i  $b$  i es va calcular el coeficient de determinació ( $R^2$ ), el grau de significació ( $P>F$ ) i la normalitat dels residus (prova de Shapiro-Wilk)

#### 4.2.3. Anàlisi estadística de l'efecte del tipus d'interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en la cinètica de sortida d'electròlits

A fi de determinar l'efecte dels tractaments es van comparar els paràmetres  $K_0$  i  $b$  (veure Figura 1.4), que defineixen la taxa de sortida d'electròlits ( $K$ ) al llarg del temps ( $K(t)=K_0+b t$ ) del model matemàtic monomolecular (equació 4 pàg. 51).

En tots els experiments les variàncies dels valors dels dos paràmetres pels diferents tractaments es van mostrar homogènies segons la prova de Bartlett ( $(P>F)>0.05$ ) i els residus van presentar distribució normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W>0.70$ ,  $(P<W)>0.05$ ).

**Taula 2.22.** Efecte del tipus d'interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en la cinètica de sortida d'electròlits dels discs de fulla

Planta	Espècie bacteriana <sup>1</sup>	Tract. amb fosetil-Al <sup>2</sup>	Paràmetres			
			$K_0$	b		
Tabac	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (C) <sup>1</sup>	No	0.0049	b	-0.0072	b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (C)	Si	-0.0348	c	-0.0310	b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37 (I)	No	0.1127	a	0.0031	a
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37 (I)	Si	-0.1068	d	-0.1147	c
Perera (Exp. 1)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37(C)	No	-0.0100	b	-0.0101	b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37(C)	Si	0.0205	a	-0.0002	a
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (I)	No	0.0151	a	-0.0015	a
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (I)	Si	0.0079	a	-0.0002	a
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831 (CAv)	No	0.0072	a	-0.0002	a
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831 (CAv)	Si	0.0029	a	-0.0001	a
	<i>P. fluorescens</i> 88.1 (NI)	Si	0.0029	a	-0.0001	a
	<i>P. fluorescens</i> 88.1 (NI)	No	-0.0220	c	-0.0159	e
Perera (Exp. 2)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37 (C)	Si	0.0016	a b	-0.0056	d
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37 (C)	No	0.0025	a	-0.0051	cd
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (I)	Si	0.0144	a	-0.0014	ab
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (I)	No	-0.0012	b	-0.0026	bc
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831 (CAv)	Si	0.0097	a	-0.0001	ab
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831 (CAv)	No	0.0088	a	-0.0001	ab
	<i>P. fluorescens</i> 88.1 (NI)	Si	0.0062	a	0.0001	a
	<i>P. fluorescens</i> 88.1 (NI)	No	0.0062	a	0.0001	a
Perera (Exp. 3)	<i>E. amylovora</i> 1430 (C)	No	0.0022	bc	-0.0085	c
	<i>E. amylovora</i> 1430 (C)	Si	0.0081	a b	-0.0035	ab
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (I)	No	-0.0112	c	-0.0055	bc
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106 (I)	Si	0.0278	a	-0.0003	a
Perera (Exp. 4)	<i>E. amylovora</i> 1430 (C)	No	0.0058	a	-0.0092	a
	<i>E. amylovora</i> 1430 (C)	Si	0.0112	a	-0.0048	a

<sup>1</sup> Entre parèntesi s'indica el tipus d'interacció bacteri-planta C: compatible, I: incompatible, NI: no interacció i Av: bacteri avirulent

<sup>2</sup> Els valors de  $K_0$  i b són la mitjana de les repeticions de cada tractament (Taulas 2.16 a 2.20). Per un mateix experiment i paràmetre valors seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ )

En tabac es van obtenir valors de  $K_0$  significativament diferents en tots els tractaments. En les plantes tractades amb fosetil-Al els valors de  $K_0$  van ser negatius i significativament diferents en les dues situacions (compatible i incompatible), mentre que en les plantes no tractades el paràmetre va presentar valors positius i també significativament diferents en les dues combinacions bacteri-planta. Els valors del paràmetre b van ser significativament diferents en funció del tipus d'interacció. En la situació compatible no es van observar diferències segons el tractament amb fosetil-Al, mentre que en la incompatible sí (Taula 2.22).

**Taula 2.23.** Efecte de la varietat de mongetera, el bacteri infiltrat i el tractament de les plantes amb fosfonats en la cinètica de sortida d'electròlits en els discs de fulla infiltrats

Varietat	Bacteri	Fosfonats	Paràmetres <sup>2</sup>			
			$K_0$	$b$		
<i>(Exp. 1)</i>						
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	0.0795	a	0.0021	a
Vaillant	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	0.0225	b	-0.0006	a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	0.0610	a	0.0004	a
Vaillant	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	0.0200	b	0.0004	a
<i>(Exp. 2)</i>						
Coco	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	0.0583	a	<-0.0001	a
Dorabel *	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	-0.0065	c	-0.0026	a
Coco	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	0.0403	b	-0.0097	a
Dorabel	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	0.0035	b	-0.0015	a
<i>(Exp. 3)</i>						
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	0.0355	a	-0.0022	a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	-0.0115	bc	-0.0040	a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Fosetil-Al	0.0122	a b	-0.0025	a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Etefon (reg.)	-0.0243	c	-0.0150	c
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Etefon (polv.)	-0.0209	bc	-0.0086	bc
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Fosfomicina	-0.0143	bc	-0.0047	ab

<sup>2</sup> Els valors de  $K_0$  i  $b$  són la mitjana de les repeticions de cada tractament (Taula 2.21). Per un mateix experiment, valors d'un paràmetre seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ )

\* Les funcions obtingudes per alguna de les repeticions del tractament no presentaven els residus distribuïts de forma normal (Taula 2.20).

En perera, la infiltració de *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37 en plantes no tractades amb fosetil-Al (situació compatible) va donar valors de  $K_0$  i  $b$  inferiors i significativament diferents a la resta de tractaments. Aquest tractament va ser l'únic en el que els valors de  $K_0$  van ser inferiors a 0. No es van observar diferències entre els valors de  $K_0$  i  $b$  de la situació compatible en plantes tractades amb fosetil-Al i de la situació incompatible. En les plantes infiltrades amb *E. amylovora* 1430 (situació compatible) no es van observar diferències en el valor de  $K_0$  entre les plantes tractades amb fosetil-Al i les no tractades, però sí en els valors de  $b$ .

En mongetera, la infiltració dels bacteris fitopatògens en les varietats Michelet i Dorabel (sensibles) va donar valors de  $K_0$  significativament superiors als de les varietats Vaillant i Coco (resistents), respectivament. Per una mateixa varietat no es van observar diferències en els valors del paràmetre entre els dos bacteris infiltrats (situacions

compatible i incompatible). En els valors de  $b$  no es van observar diferències entre varietats ni entre bacteris en cap dels experiments (Taula 2.23).

En els discs de plantes de mongetera tractades amb diversos fosfonats i infiltrats amb *P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68 no es van observar diferències en els valors de  $K_0$  respecte les plantes no tractades amb fosfonats i inoculades amb el mateix bacteri. Els valors de  $b$  en discs de plantes tractades amb etefon van ser significativament inferiors als de discs de plantes no tractades o tractades amb foseetil-Al.

#### 4.2.4. Anàlisi estadística de l'efecte de la interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en el temps de pèrdua mitjana d'electròlits en discs foliars ( $t_{50}$ )

A partir de les equacions obtingudes en l'ajust de les dades de conductivitat al llarg del temps al model monomolecular, es va calcular el temps necessari per assolir valors de conductivitat del 50% de la conductivitat màxima ( $t_{50}$ ).

Es va realitzar la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer per comparar els valors de  $t_{50}$  dels diferents tractaments (Taulas 2.24 i 2.25). Aquests valors van presentar les variàncies homogènies segons la prova de Bartlett ( $(P>F)>0.05$ ) i els residus es van distribuir normalment segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W>0.80$ ,  $(P<W)>0.05$ ).

En tabac, la pèrdua d'electròlits va ser més lenta (valors de  $t_{50}$  significativament superiors) en discs de plantes no tractades amb foseetil-Al infiltrats amb *P. syringae* pv. *tabaci* 2106 (compatible) que en els de plantes tractades amb foseetil-Al i infiltrats amb el mateix bacteri, o que en els infiltrats amb *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37 (incompatible) independentment del tractament amb foseetil-Al (Taula 2.24). No es van observar diferències entre els valors de  $t_{50}$  de la situació compatible en plantes tractades amb foseetil-Al i els de la situació incompatible en plantes no tractades. En la situació incompatible no es van observar diferències significatives en el  $t_{50}$  en funció del tractament de les plantes amb foseetil-Al.

En perera, els valors de  $t_{50}$  en discs de plantes no tractades amb foseetil-Al infiltrats amb *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37 (situació compatible) van ser significativament inferiors als de plantes tractades amb foseetil-Al i als de la situació incompatible independentment del tractament amb foseetil-Al. No es van observar diferències entre els

$t_{50}$  de la situació compatible en plantes tractades amb fosetil-Al i els de la situació incompatible en plantes no tractades. En totes les interaccions el tractament de les plantes amb fosetil-Al va provocar un augment significatiu del  $t_{50}$  respecte les plantes no tractades. En els discs infiltrats amb *E. amylovora* no es van observar diferències en els valors de  $t_{50}$  en funció del tractament de les plantes amb fosetil-Al (Taula 2.24).

**Taula 2.24.** Efecte del tipus d'interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en el temps de pèrdua mitjana d'electròlits ( $t_{50}$ ) en discs de fulla de diferents espècies vegetals

Planta	Espècie bacteriana	Tractament fosetil-Al <sup>a</sup>	$t_{50}$ <sup>b</sup> (hores)
Tabac	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	No	12.84 a
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	Si	7.54 b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	5.81 b c
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	Si	5.18 c
Perera (Exp. 1)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	12.64 c
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	Si	19.44 b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	No	33.37 b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	Si	50.43 a
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831	No	>50
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831	Si	>50
	<i>P. fluorescens</i> 88.1	Si	>50
Perera (Exp. 2)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	10.87 c
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	Si	15.58 b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	No	16.26 b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	Si	29.16 a
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831	No	24.01 a b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2831	Si	>50
	<i>P. fluorescens</i> 88.1	No	>50
	<i>P. fluorescens</i> 88.1	Si	>50
Perera (Exp. 3)	<i>E. amylovora</i> 1430	No	12.49 b
	<i>E. amylovora</i> 1430	Si	17.90 a b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	No	18.87 b
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 2106	Si	19.22 a
Perera (Exp. 4)	<i>E. amylovora</i> 1430	No	12.43 a
	<i>E. amylovora</i> 1430	Si	15.66 a

<sup>c</sup> Els valors de  $t_{50}$  es van estimar a partir de les equacions obtingudes per cada repetició dels diferents tractaments. Cada valor és la mitjana de les repeticions de cada tractament. Per un mateix experiment valors seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ). Els tractaments en que es van obtenir temps ( $t_{50}$ ) superiors a la durada de la incubació (superior a 50 hores) no es van considerar per a la separació de mitjanes. En tots els experiments, excepte l'exp. 4 realitzat en perera, l'anàlisi de la variància va donar un efecte significatiu del tractament en el  $t_{50}$  ( $R^2>0.80$ , ( $P>F$ ) $<0.001$ )

**Taula 2.25.** Efecte del tipus d'interacció bacteri-planta i del tractament amb fosfonats en el temps de pèrdua mitjana d'electròlits ( $t_{50}$ ) de discs de fulla de diferents varietats de mongetera

<b>Varietat de mongetera</b>	<b>Espècie bacteriana</b>	<b>Tractament amb fosfonats</b>	<b><math>t_{50}</math> z (hores)</b>
<i>(Exp. 1)</i>			
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	25.04 b
Vaillant	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	40.00 a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	10.30 c
Vaillant	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	11.80 c
<i>(Exp. 2)</i>			
Coco	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	27.59 a
Dorabel	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	28.94 a
Coco	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	12.80 b
Dorabel	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	7.14 b
<i>(Exp. 3)</i>			
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2027.37	No	16.35 b c
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	No	21.80 a
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Fosetil-Al	18.99 a b c
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Etefon (reg)	14.40 c
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Etefon (polv.)	15.31 c
Michelet	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> SD68	Fosfomicina	20.66 a b

<sup>z</sup> Els valors de  $t_{50}$  es van estimar a partir de les equacions obtingudes per cada repetició dels diferents tractaments. Cada valor és la mitjana de les repeticions de cada tractament. Per un mateix experiment valors seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ). En tots els experiments l'anàlisi de la variància va donar un efecte significatiu del tractament en el  $t_{50}$  ( $R^2>0.80$ , ( $P>F$ ) $<0.001$  )

En mongetera, la sortida d'electròlits va ser significativament més lenta en els discs infiltrats amb el patogen (*P. syringae* pv. *phaseolicola* SD68) que en els infiltrats amb *P. syringae* pv. *syringae* 2027.37 (resposta incompatible), en totes les varietats (tant sensibles com resistents). No es van observar diferències significatives en els valors de  $t_{50}$  en infiltrar el patogen entre les varietats Coco (sensible) i Dorabel (resistent), però sí entre les varietats Michelet (sensible) i Vaillant (resistent), obtenint una resposta significativament més ràpida en la varietat sensible (Taula 2.25).

La sortida d'electròlits en discs de fulla de mongetera de la varietat Michelet infiltrats amb la soca patògena va ser significativament més ràpida ( $t_{50}$  inferiors) en les plantes tractades amb etefon que en les no tractades. No es van observar diferències significatives en el  $t_{50}$  entre les plantes tractades amb fosetil-Al, fosfomicina i les no tractades amb fosfonats.

## 5. Activitat dels fosfonats en el control de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera

### 5.1. Efecte del fosetil-Al aplicat a diferents concentracions

#### 5.1.1. Branques forçades a floració

Es van inocular amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 fulles de corimbos florals de branques de perera de la varietat Grand Champion forçades a floració en solucions de sacarosa amb fosetil-Al a diferents concentracions. Passat el període d'incubació es va avaluar la severitat de la infecció utilitzant els índexs de severitat descrits a la Taula 2.6. A la Taula 2.26 es mostren les freqüències dels índexs de severitat per cada tractament. Tractaments amb elevada freqüència d'índexs 0 i 1 corresponen a absència d'infeccions o a infeccions localitzades al punt d'inoculació, mentre que tractaments amb elevada freqüència d'índexs 2 i 3 corresponen al desenvolupament d'infeccions del patogen que van progressar més o menys per la superfície de la fulla a partir del punt d'inoculació. En les fulles de les plantes inoculades amb aigua estèril no es van desenvolupar símptomes d'infecció.

En les fulles de branques forçades a floració en solucions de sacarosa sense fosetil-Al o amb baixes concentracions de fosetil-Al ( $0.3 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ ) i inoculades amb el patogen, es va obtenir una elevada freqüència d'infeccions progressives per la superfície de les fulles. En augmentar la concentració de fosetil-Al va disminuir la freqüència d'infeccions progressives, incrementant les infeccions localitzades al punt d'inoculació.

En les branques forçades a floració en solucions amb fosetil-Al a concentracions superiors a  $0.93 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  van observar-se problemes de fitotoxicitat en les fulles (necrosis foliars i caiguda de fulles) i en les flors (flors necrosades, caiguda de pètals). A aquestes concentracions entre el 60 i el 80 % de les fulles van presentar necrosis degudes a fitotoxicitat i la majoria de flors dels corimbos van quedar sense pètals. A concentracions de fosetil-Al inferiors no es van observar aquests problemes.

A partir dels índexs de severitat per fulla es va calcular la severitat de la infecció per cada repetició dels tractaments amb la fórmula descrita a la pàg. 162.

**Taula 2.26.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fulles de branques de perera de la varietat Grand Champion forçades a floració en solucions amb sacarosa (1%) i fosetil-Al a diferents concentracions i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

Dosi de fosetil-Al (g HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> l <sup>-1</sup> )	any 1994				Dosi de fosetil-Al (g HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> l <sup>-1</sup> )	any 1995			
	Índex de severitat					Índex de severitat			
	0	1	2	3		0	1	2	3
0.00	4	10	10	12	0.00	4	5	7	11
0.18	5	6	14	11	0.18	5	6	9	7
0.93	18	3	12	3	0.62	12	5	8	2
1.86	9	18	7	2	0.93	13	13	1	0

Per cada tractament es van fer 3 repeticions de 12 fulles l'any 1994 i 3 repeticions de 9 fulles l'any 1995. En cada fulla es van inocular 20 µl de suspensions d'1x10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup> del patògen sobre una ferida. Les fulles inoculades es van incubar durant 48 hores a 25 °C, 16 h llum i 18 °C, 8 h fosc i humitat relativa superior al 90%  
Cada valor correspon al nombre de fulles de cada tractament que van presentar cada un dels índexs de severitat (descrits a la Taula 2.6)

**Taula 2.27.** Efecte de la dosi de fosetil-Al en la severitat de la infecció en fulles de branques de perera de la varietat Grand Champion forçades a floració i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

Font de variació	Graus de llibertat	Suma de quadrats	F	P>F
Dosi <sup>a</sup>	1	5674.22	45.38	0.0000
Experiment <sup>b</sup>	1	36.73	0.29	0.5938
Dosi x Experiment	1	1169.55	9.35	0.0062
Error	20	2500.43		

Anàlisi de la covariància realitzada amb els valors de severitat de la infecció de 3 repeticions per tractament i experiment  
<sup>a</sup> Les branques es van forçar a floració en solucions de sacarosa (1%) i fosetil-Al a les concentracions 0, 0.18, 0.62, 0.93 o 1.86 g HPO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>. Les fulles situades a la base dels corimbos florals es van inocular amb 20 µl de suspensions d'1 x 10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup> del patògen realitzant ferida i es van incubar durant 48 hores a 25 °C, 16 h llum i 18 °C, 8 h fosc i humitat relativa superior al 90%  
<sup>b</sup> L'experiment es va repetir dues vegades (anys 1994 i 1995)

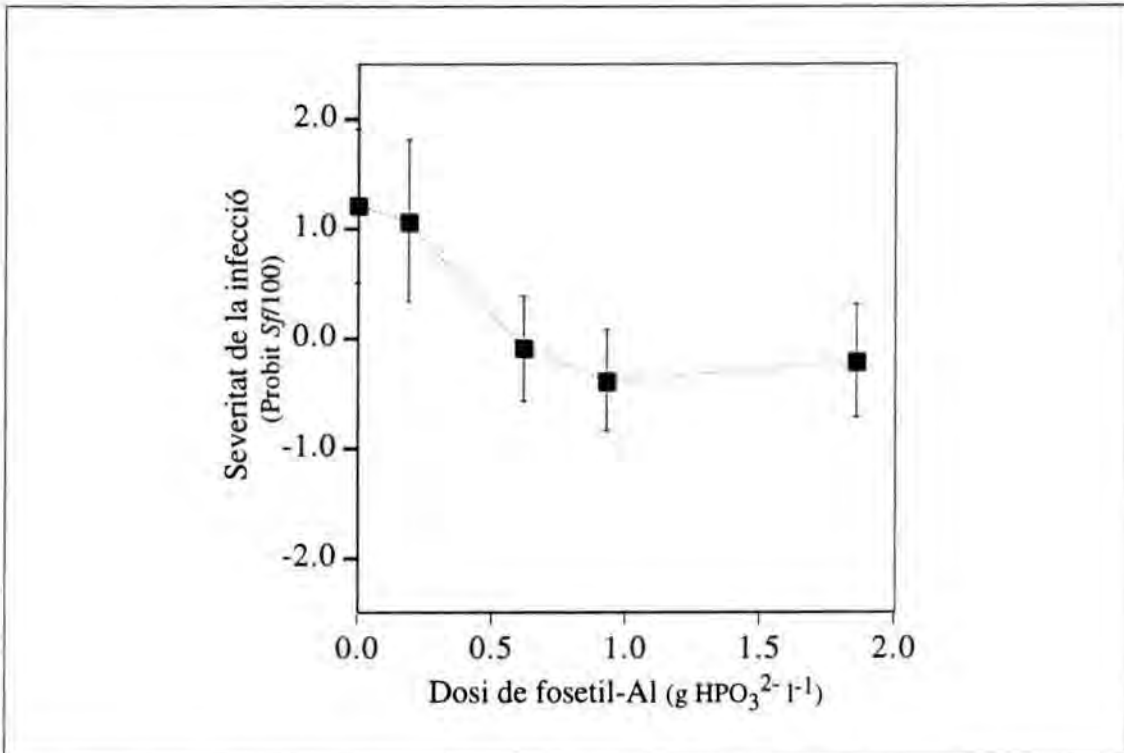


La severitat de la infecció va presentar les variàncies homogènies segons la prova de Bartlett ( $P=0.851$ ) i els residus es van distribuir normalment segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.95$ , ( $P>W$ )= $0.310$  ).

L'anàlisi de la covariància va indicar un efecte significatiu de la concentració de fosetil-Al en la severitat de la infecció (Taula 2.27). No es va observar efecte de la repetició de l'experiment. En no haver-hi diferències entre les dues repeticions de l'experiment es van calcular les mitjanes de la severitat de la infecció per cada tractament a partir dels valors dels dos experiments junts.

En les fulles de les branques portades a floració sense fosetil-Al i amb fosetil-Al a la dosi de  $0.18 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  es van obtenir valors de severitat de la infecció similars (entre 80 i 90 %). En augmentar la dosi de fosetil-Al es va produir una disminució en la severitat de la infecció passant d'una severitat del 80% a la dosi més baixa de fosetil-Al utilitzada a una severitat del 40% a la dosi de  $0.62 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  fins a una severitat del 30% a la dosi de  $0.93 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  (Figura 2.23). A dosis de fosetil-Al superiors a  $0.93 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  no es va observar reducció de la malaltia, obtenint nivells de severitat d'entre el 30 i el 40% en els tractaments amb  $1.86 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ . A aquesta concentració van aparèixer problemes de fitotoxicitat en les fulles.

Amb els valors de severitat de la infecció dels dos experiments amb 3 repeticions per experiment es va calcular, per regressió lineal simple, la funció que relacionava la severitat de la infecció ( $Sf$ ) transformada en Probit ( $Sf/100$ ) amb la dosi de fosetil-Al (transformada en  $\text{Log}_{10}$ ). A partir d'aquesta equació es va calcular la dosi efectiva mitjana de fosetil-Al ( $DE_{50}$ ) corresponent a la concentració necessària per reduir la severitat de la infecció en un 50% (Taula 2.28). La dosi efectiva mitjana de fosetil-Al va ser de  $0.56 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ . Per reduir la severitat de la infecció en un 90 % serien necessàries dosis de fosetil-Al superiors a la dosi màxima avaluada i a aquestes dosis apareixen problemes de fitotoxicitat.



**Figura 2.23.** Severitat de la infecció en funció de la dosi de fosetil-Al en fulles de branques de perera de la varietat Grand Champion portades a floració en solucions de sacarosa (1%) amb fosetil-Al a diferents concentracions i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Cada valor correspon a la mitjana de dos experiments amb tres repeticions per experiment. Les barres d'error representen l'interval de confiança de la mitjana ( $P=0.05$ ).

**Taula 2.28.** Dosi efectiva mitjana ( $DE_{50}$ ) de fosetil-Al en fulles de branques de perera de la varietat Grand Champion forçades a floració i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

Origen <sup>c</sup>	Pendent <sup>c</sup>	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>	Prob>F <sup>b</sup>	DE <sub>50</sub> <sup>c</sup> (g HPO <sub>3</sub> l <sup>-1</sup> )
-0.24 (0.13)	-1.36 (0.23)	0.64	0.0000	0.56 (0.08)

Funció obtinguda per regressió lineal simple de la severitat de la infecció per fulla (Probit(S/100)) sobre la concentració de fosetil-Al (Log<sub>10</sub>). Per cada tractament es van utilitzar els valors dels dos experiments amb tres repeticions per experiment

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> de l'ajust dels valors predits pel model lineal respecte els observats

<sup>b</sup> Probabilitat del model lineal

<sup>c</sup> Entre parèntesi s'indica l'error estàndard

### 5.1.2. Plantes de perera mantingudes en hivernacle

En les fulles de plantes no tractades i en les de plantes tractades amb fosetil-Al a dosis baixes ( $0.62 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ ) i inoculades amb el patogen, es va observar una elevada freqüència d'infeccions progressives per la superfície de la fulla a partir del punt d'inoculació (Taula 2.29). En augmentar la concentració de fosetil-Al es va observar una disminució en la freqüència d'infeccions progressives i un augment d'infeccions bloquejades i fins i tot, d'absència d'infeccions a dosis de fosetil-Al superiors a  $2.7 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ . Per cap de les concentracions de fosetil-Al avaluades van observar-se problemes de fitotoxicitat en les plantes. En les fulles inoculades amb aigua destil·lada estèril no es van observar infeccions.

Les variàncies de la severitat de la infecció dels diferents tractaments en les dues repeticions de l'experiment juntes no es van mostrar homogènies segons la prova de Bartlett ( $(P>F) 0.05$ ), mentre que per cada una de les repeticions de l'experiment per separat sí ( $(P>F)=0.848$  i  $(P>F)=0.156$ , respectivament). Els residus van presentar una distribució normal en cada repetició de l'experiment ( $W=0.92$ ,  $(P<W)=0.124$  i  $W=0.98$ ,  $(P<W)=0.783$ , respectivament). L'anàlisi de la covariància per determinar l'efecte de la concentració de fosetil-Al en la severitat de la infecció es va realitzar per cada una de les dues repeticions de l'experiment per separat.

En les dues repeticions de l'experiment es va observar un efecte significatiu de la concentració de fosetil-Al en la severitat de la infecció ( $P<0.001$ ) (Taula 2.30). Les fulles de plantes tractades amb fosetil-Al van presentar una disminució en la severitat de la infecció respecte les de plantes no tractades. La disminució de la severitat va ser proporcional a l'augment de la concentració del fosfonat (Figura 2.24). Es van obtenir diferents valors de severitat de la infecció per cada concentració de fosetil-Al en les dues repeticions de l'experiment, tot i que la severitat en les fulles de les plantes no tractades amb fosfonats i inoculades amb el patogen, va ser similar en els dos assajos (80-90%). En l'experiment realitzat l'any 1995 es van obtenir nivells de severitat de la infecció més elevats que en el realitzat l'any 1994, per tots els tractaments. En l'experiment realitzat l'any 1995 a les concentracions de 3 a  $5 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  de fosetil-Al es va produir una reducció del 50% en la severitat de la infecció respecte les plantes no tractades, mentre que en l'experiment realitzat l'any 1994 aquesta reducció es va obtenir en les aplicacions de fosetil-Al a dosis d'1 a  $2 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ . Es van aconseguir reduccions de la severitat de la infecció de fins al 75-80 % respecte les plantes no tractades, a dosis superiors a  $6 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  l'any 1995 i de  $3 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  l'any 1994.

**Taula 2.29.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació amb fosetil-Al a diferents concentracions i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

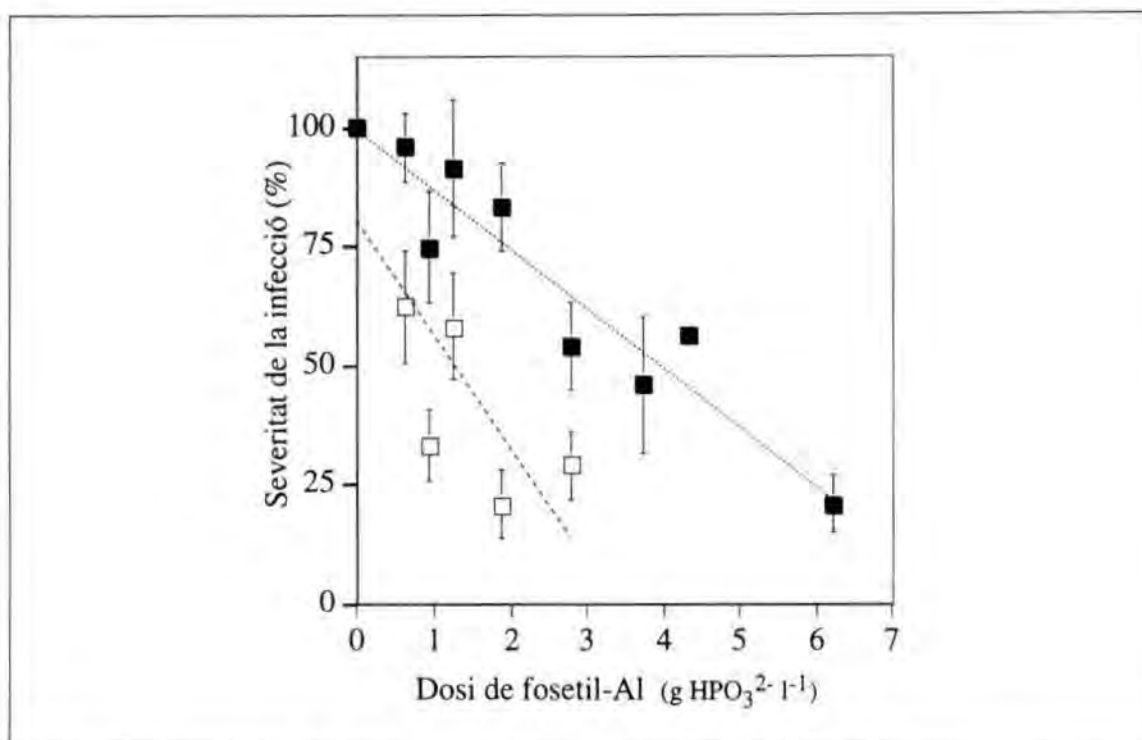
Dosi de fosetil-Al (g HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> l <sup>-1</sup> )	any 1994				any 1995			
	Índex de severitat				Índex de severitat			
	0	1	2	3	0	1	2	3
0.00	0	0	5	22	0	0	6	21
0.62	4	0	19	4	0	0	6	21
0.93	2	25	0	0	0	5	15	7
1.24	3	10	11	3	3	0	8	16
1.86	13	14	0	0	3	0	10	14
2.79	10	17	0	0	6	8	7	6
3.72	-	-	-	-	0	27	0	0
4.34	-	-	-	-	8	10	9	0
6.20	-	-	-	-	15	10	2	0

Les plantes es van regar durant 5 dies amb 100 ml diaris de solucions de fosetil-Al a les diferents concentracions  
 Les inoculacions es van realitzar sobre fulles joves separades de la planta dipositant 20 µl de suspensions d'1 x 10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup> del patogen sobre una ferida realitzada en el nervi principal de la fulla. La severitat de la infecció es va avaluar a les 48 hores d'incubació a 25 °C, 16 hores llum i 18°C, 8 hores fosc i humitat relativa superior al 90%  
 L'experiment es va repetir dues vegades (anys 1994 i 1995)

**Taula 2.30.** Efecte de la concentració de fosetil-Al en la severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

	Font de variació	Graus de llibertat	Suma de quadrats	F	P>F
Experiment 1 (1994)	Dosi fosetil-Al <sup>a</sup>	1	10352.25	29.10	0.0001
	Error	16	5692.68		
Experiment 2 (1995)	Dosi fosetil-Al <sup>a</sup>	1	15263.76	59.67	0.0000
	Error	25	6395.01		

Anàlisi de la covariància realitzada amb la mitjana dels valors de severitat tres repeticions per tractament i experiment  
<sup>a</sup> A la Taula 2.29 s'indiquen les dosis de fosetil-Al utilitzades en cada una de les repeticions de l'experiment



**Figura 2.24.** Severitat de la infecció en fulles de plantes de perera de la varietat Conference regades durant 5 dies amb 100 ml diaris de fosetil-Al a diferents concentracions i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Cada valor correspon a la mitjana de tres repeticions. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana. L'experiment es va repetir dues vegades (anys 1994 punts blancs, i 1995 punts negres).

**Taula 2.31.** Dosi efectiva mitjana (DE<sub>50</sub>) de fosetil-Al en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference regades amb fosetil-Al a diferents concentracions i inoculades amb *P. syringae* pv *syringae* EPS94

Experiment	Origen <sup>c</sup>	Pendent <sup>c</sup>	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>	Prob>F <sup>b</sup>	DE <sub>50</sub> <sup>c</sup> (g HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> l <sup>-1</sup> )
1 (1994)	80.26 (8.90)	-23.89 (5.82)	0.51	0.0008	1.27 (<0.001)
2 (1995)	99.14 (4.96)	-12.45 (1.61)	0.70	0.0000	3.95 (<0.001)

Funció obtinguda per regressió lineal simple de la severitat de la infecció sobre la concentració de fosetil-Al. Per cada experiment es van utilitzar els valors de severitat de tres repeticions per tractament

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> de l'ajust dels valors predits pel model lineal respecte els observats

<sup>b</sup> Probabilitat del model lineal

<sup>c</sup> Entre parèntesi s'indica l'error estàndard

Amb els valors de severitat de la infecció de les repeticions de cada tractament es van obtenir, per cada un dels experiments, per regressió lineal simple, les funcions que relacionen la severitat de la infecció ( $Sf$ ) transformada en Probit ( $Sf/100$ ) amb la concentració de fosetil-Al transformada en  $\log_{10}$  (Taula 2.31). A partir d'aquestes funcions es va calcular dosi efectiva mitjana de fosetil-Al ( $DE_{50}$ ).

La  $DE_{50}$  va ser diferent en funció de l'experiment (Taula 2.31). En l'experiment realitzat l'any 1994 la  $DE_{50}$  va ser d'1.27 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$ , mentre que en l'experiment realitzat l'any 1995 es va obtenir una  $DE_{50}$  de 3.95 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$ .

## 5.2. Efecte del fosfonat potàssic aplicat a diferents concentracions

Es van regar plantes de perera de la varietat Conference amb solucions de fosfonat potàssic a diferents concentracions i es van inocular les fulles joves separades de les plantes amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. A la Taula 2.32 es presenta la freqüència dels índexs de severitat de la infecció en cada tractament i repetició de l'experiment.

En el 100% de les fulles de plantes no tractades amb fosfonat potàssic i inoculades amb el patogen es van produir infeccions progressives pels nervis i la superfície de la fulla. No es van observar fulles inoculades amb el patogen amb necrosis bloquejades. En les fulles inoculades amb aigua estèril no es van desenvolupar infeccions. En les plantes tractades amb fosfonat potàssic i inoculades amb el patogen es va observar una disminució de les infeccions progressives i un augment de les infeccions bloquejades, localitzades al punt d'inoculació. En l'experiment realitzat l'any 1994 en les fulles de les plantes tractades amb fosfonat potàssic i inoculades amb el patogen no es van observar necrosis progressives per la superfície de la fulla. En les dues repeticions de l'experiment en augmentar la dosi de fosfonat potàssic es va produir una disminució de la freqüència d'infeccions i de la severitat de la infecció (Taula 2.32).

A partir dels índex de severitat es va calcular la severitat de la infecció per tractament i repetició amb la fórmula descrita a la pàg. 162. Les variàncies dels valors de severitat de la infecció pels diferents tractaments es van mostrar homogènies d'acord amb la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.609$ ), i els residus van presentar una distribució normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W= 0.96$ ,  $(P<W)=0.649$ ).

**Taula 2.32.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació amb fosfonat potàssic a diferents concentracions i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

Dosi de fosfonat potàssic (g HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> l <sup>-1</sup> )	1994				1995			
	Índex de severitat				Índex de severitat			
	0	1	2	3	0	1	2	3
0.00	0	0	5	22	0	0	6	21
0.93	3	4	20	0	3	4	11	9
1.86	12	11	4	0	10	6	6	5

Les plantes es van regar durant 5 dies amb 100 ml diaris de solucions de fosfonat potàssic a les diferents concentracions. Per cada tractament es van regar 30 plantes

Les inoculacions es van realitzar sobre les fulles més joves de cada planta dipositant 20 µl de suspensions d'1 x 10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup> del patogen sobre una ferida realitzada en el nervi principal de la fulla. Per cada tractament es van inocular tres repeticions de 9 fulles. La severitat de la infecció es va avaluar al cap de 48 hores d'incubació a 25 °C, 16 hores llum i 18°C, 8 hores fosc i humitat relativa superior al 90%

L'experiment es va repetir dues vegades (anys 1994 i 1995)

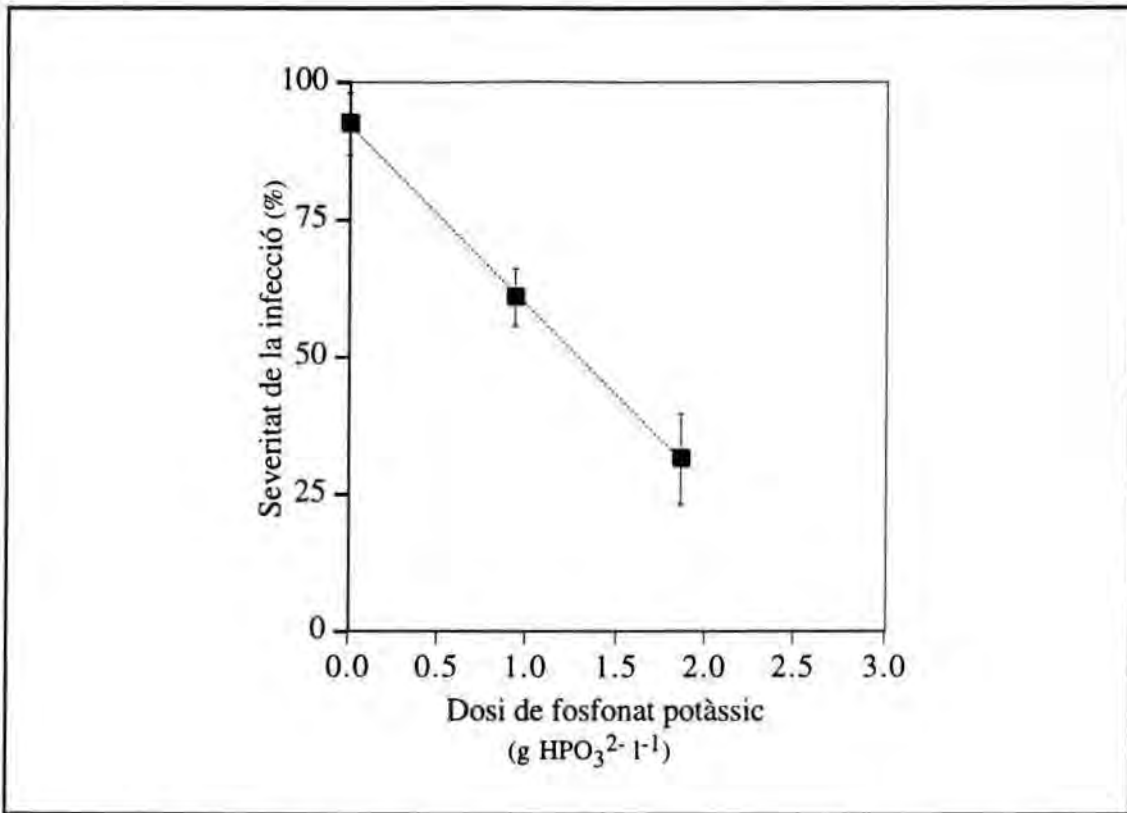
**Taula 2.33.** Efecte de la dosi de fosfonat potàssic en la severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

Font de variació	Graus de llibertat	Suma de quadrats	F	P>F
Dosi <sup>a</sup>	1	11203.70	70.37	0.0000
Experiment <sup>b</sup>	1	0.69	0.01	0.9486
Dosi x Experiment	1	504.11	3.17	0.0969
Error	14	2229.08		

Anàlisi de la covariància realitzada amb la mitjana dels valors de severitat de la infecció de tres repeticions per tractament i experiment

<sup>a</sup> Les dosis de fosfonat potàssic aplicades van ser 0, 0.93 o 1.86 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>. Per cada tractament es van inocular tres repeticions de 9 fulles

<sup>b</sup> L'experiment es va repetir dues vegades



**Figura 2.25.** Severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference regades amb 100 ml diaris de fosfonat potàssic durant 5 dies i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Cada valor correspon a la mitjana de dos experiments amb tres repeticions per experiment. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana ( $P=0.05$ ).

**Taula 2.34.** Dosi efectiva mitjana ( $DE_{50}$ ) de fosfonat potàssic en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv *syringae* EPS94

Origen <sup>a</sup>	Pendent <sup>c</sup>	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>	Prob>F <sup>b</sup>	DE <sub>50</sub> <sup>c</sup> (g HPO <sub>3</sub> l <sup>-1</sup> )
92.28 (5.45)	-32.85 (4.54)	0.77	0.0000	1.29 (0.01)

Funció lineal calculada per regressió simple de la severitat de la infecció sobre la concentració de fosfonat potàssic amb els valors de severitat de dos experiments amb tres repeticions per experiment

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> de l'ajust dels valors predits pel model lineal respecte els observats

<sup>b</sup> Probabilitat del model lineal

<sup>c</sup> Entre parèntesi s'indica l'error estàndard



L'anàlisi de la covariància va mostrar un efecte molt significatiu de la concentració de fosfonat potàssic en la severitat de la infecció ( $(P>F)<0.001$ ). No es van observar diferències entre repeticions de l'experiment (Taula 2.33). Degut a això, es van barrejar les repeticions dels dos experiments, de manera que cada tractament va constar de 6 repeticions (2 experiments amb 3 repeticions per experiment).

En les fulles de plantes tractades amb fosfonat potàssic es va observar una reducció en la severitat de la infecció respecte les plantes no tractades amb fosfonat. En augmentar la concentració de fosfonat potàssic es va produir una disminució de la severitat de la infecció (Figura 2.25). En les fulles de les plantes regades amb fosfonat potàssic a la concentració de  $0.93 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  la severitat de la infecció va disminuir en un 35 % respecte les plantes no tractades. En les plantes regades amb  $1.86 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  de fosfonat potàssic la severitat es va reduir en un 60 % respecte el control no tractat. La disminució de la severitat de la infecció en funció de l'augment de la dosi de fosfonat potàssic va ser lineal.

Amb els valors de severitat de la infecció dels dos experiments es va realitzar una regressió lineal simple de la severitat respecte la concentració de fosfonat potàssic (Taula 2.34). Amb la funció obtinguda es va estimar la dosi efectiva mitjana de fosfonat potàssic ( $DE_{50}$ ), que va ser d' $1.29 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ .

### 5.3. Efecte de diferents fosfonats aplicats a la mateixa dosi

A la Taula 2.35 es presenta la freqüència dels índexs de severitat de la infecció en fulles de plantes de perera de la varietat Conference regades amb diferents fosfonats i inoculades amb les soques EPS17a i EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae*.

En el 100 % de les fulles de les plantes no tractades amb fosfonats i inoculades amb el patògen es van obtenir infeccions, de les quals el 97 % van correspondre a infeccions progressives pels nervis o per la superfície foliar. El tractament de les plantes amb fosfonats va provocar una disminució del nombre d'infeccions. El 27 % de les fulles de plantes tractades amb fosfonats no van presentar símptomes d'infecció. En les fulles amb símptomes i tractades amb fosfonats la majoria de les infeccions van quedar localitzades al punt d'inoculació. Només el 28% del total de fulles i inoculades amb el patògen van presentar infeccions progressives de les quals només un 2.6 % van correspondre a necrosis de part o tota la superfície foliar (índex de severitat 3).

**Taula 2.35.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en inocular les soques EPS17a i EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació amb diferents fosfonats

Tractament		Soca de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>							
		EPS17a				EPS94			
		Índex de severitat				Índex de severitat			
		0	1	2	3	0	1	2	3
1994	Control no tractat	0	0	6	3	0	0	7	2
	Fosfonat potàssic	1	5	3	0	0	5	4	0
	Fosetil-Al	1	5	3	0	1	4	4	0
	Fosfomicina	0	7	2	0	3	6	0	0
	Etefon	5	3	2	0	4	2	2	0
1995	Control no tractat	0	0	3	6	0	1	4	4
	Fosfonat potàssic	4	1	3	0	1	0	3	4
	Fosetil-Al	3	5	1	0	2	9	5	0
	Fosfomicina	2	6	1	0	4	4	2	0
	Etefon	7	1	1	0	2	6	1	0

Les plantes es van regar durant 5 dies amb 100 ml diaris d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{l}^{-1}$  dels diferents fosfonats. Com a control es van regar plantes amb aigua destil·lada. Es van tallar les fulles més joves de cada planta, es van inocular amb 20  $\mu\text{l}$  de suspensions d' $1 \times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  de cada soca i es van incubar durant 48 hores a 25 °C, 16 h llum i 18°C, 8 h fosc i humitat relativa superior al 90%. Per cada producte, soca i experiment es van fer 3 repeticions de 3 fulles. L'experiment es va repetir dues vegades (1994 i 1995)

**Taula 2.36.** Efecte de diferents fosfonats en la severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae*

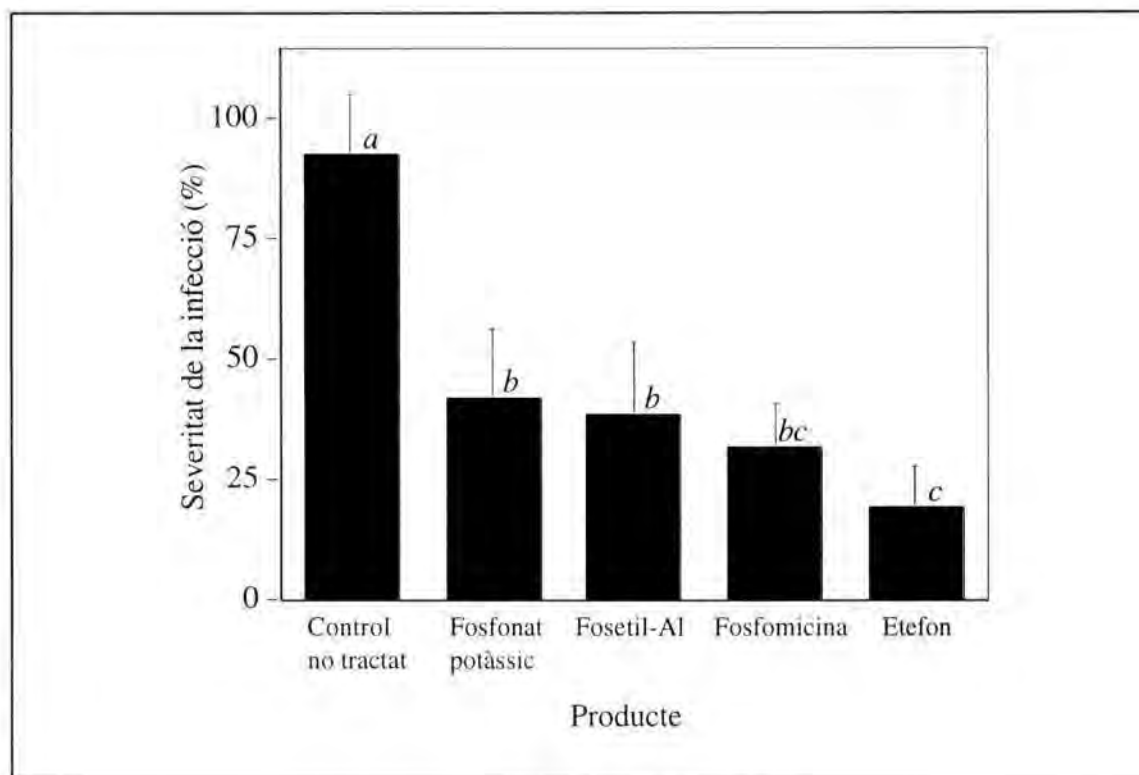
Font de variació	Graus de llibertat	Suma de quadrats	F	P>F
Producte <sup>a</sup>	4	20510.99	24.09	0.0000
Soca <sup>b</sup>	1	76.56	0.36	0.5517
Experiment <sup>c</sup>	1	128.42	0.60	0.4414
Producte x soca	4	821.28	0.97	0.4363
Producte x experiment	4	350.49	0.41	0.7992
Soca x experiment	1	533.35	2.51	0.1206
Error	44	9363.66		

Anàlisi de la variància realitzada amb les mitjanes dels valors de severitat de la infecció de tres repeticions per tractament

<sup>a</sup> Les plantes es van regar amb fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon, fosfomicina o aigua (control no tractat)

<sup>b</sup> Es van inocular les soques EPS17a o EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* en les fulles separades de les plantes

<sup>c</sup> L'experiment es va repetir dues vegades (anys 1994 i 1995)



**Figura 2.26.** Severitat de la infecció en fulles separades de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb diferents fosfonats inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae*. Cada valor correspon a la mitjana de 12 repeticions (2 soques, 2 experiments i 3 repeticions). Les barres d'error indiquen l'interval de confiança per la mitjana ( $P=0.05$ ). Tractaments amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives d'acord amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ).

Per cada un dels experiments a partir dels índexs de severitat de cada fulla es va calcular la severitat de la infecció per cada tractament i repetició tal com s'ha descrit a la pàg. 162. Els valors de severitat de la infecció pels dos experiments junts van presentar variàncies homogènies d'acord amb la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.069$ ) i els residus es van distribuir de forma normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.96$ ,  $(P<W)=0.192$ ). L'anàlisi de la variància va mostrar un efecte significatiu del tractament amb fosfonats en la severitat de la infecció ( $(P>F)=<0.001$ ), però no de la soca de patògen ni de la repetició de l'experiment (Taula 2.36).

En no observar-se diferències significatives entre experiments ni entre soques, es va calcular la mitjana de la severitat de la infecció per cada tractament considerant la soca i l'experiment com a repeticions (Figura 2.26). D'aquesta manera cada tractament va constar de 12 repeticions (2 experiments, 2 soques i 3 repeticions per experiment i soca).

Les fulles de les plantes tractades amb els fosfonats van presentar nivells de severitat de la infecció significativament inferiors als de les plantes no tractades (Figura 2.26). En els tractaments amb fosfonat potàssic i fasetil-Al es va obtenir una reducció d'un 40-50 % en la severitat de la infecció respecte les plantes no tractades amb fosfonats. No es van observar diferències significatives entre aquests dos productes segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ). En les fulles de les plantes tractades amb fosfomicina es va obtenir una reducció del 61 % en la severitat de la infecció respecte les de les plantes no tractades. La màxima reducció en la severitat de la infecció (80%) es va obtenir en les fulles de les plantes tractades amb etefon. En algunes d'aquestes plantes però, es van observar problemes de fitotoxicitat (necrosi i caiguda de fulles) i una reducció en el creixement (entrenusos més curts). En la resta de tractaments no es van observar problemes de fitotoxicitat ni anomalies en el creixement de les plantes.

#### 5.4. pH del substrat de les plantes regades amb fosfonats

Es va mesurar el pH del substrat de les plantes regades durant 5 dies amb 100 ml diaris de solucions aquoses de fasetil-Al, fosfonat potàssic, etefon i fosfomicina a la dosi d' $1.86 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  i de les regades amb aigua destil·lada (control no tractat). L'extracció es va realitzar en aigua destil·lada o en KCl 0.1M. La mesura del pH es va realitzar al cap de 30 minuts d'agitació de la mostra en cada extractant i al cap de 4 hores d'haver finalitzat l'agitació (Taula 2.38).

Les variàncies dels valors de pH dels diferents tractaments es van mostrar homogènies segons la prova de Bartlett tant per les extraccions amb aigua destil·lada amb lectura al final de l'agitació i a les 4 hores de l'agitació ( $(P>F)=0.576$  i  $(P>F)=0.263$ , respectivament) com per les extraccions amb KCl 0.1M ( $(P>F)=0.498$  i  $(P>F)=0.274$ , respectivament). Els residus pels diferents tractaments van seguir una distribució normal d'acord amb la prova de Shapiro-Wilk per totes les extraccions i mesures realitzades ( $W=0.96$ ,  $(P<W)=0.174$ ;  $W=0.97$ ,  $(P<W)=0.498$ ;  $W=0.96$ ,  $(P<W)=0.345$  i  $W=0.93$  ( $P<W)=0.065$ , respectivament). En cada extracció i temps de mesura es va observar un efecte significatiu del producte en el pH del substrat de les plantes segons l'anàlisi de la variància realitzada (Taula 2.37).

El pH del substrat va ser diferent en funció del producte aplicat. En les plantes regades amb aigua destil·lada es van obtenir valors neutres de pH significativament diferents de la resta de tractaments.

**Taula 2.37.** Efecte del tractament per irrigació amb fosfonats en el pH del substrat de plantes de perera

Mesura del pH <sup>a</sup>	Font de variació	Graus de llibertat	Suma de quadrats	F	P>F
1	Producte <sup>b</sup>	4	9.40	53.45	0.0000
	Error	25	1.09		
2	Producte <sup>b</sup>	4	7.14	45.13	0.0000
	Error	25	0.99		
3	Producte <sup>b</sup>	4	5.91	111.84	0.0000
	Error	25	0.33		
4	Producte <sup>b</sup>	4	6.39	100.03	0.0000
	Error	25	0.40		

Anàlisi de la variància realitzada amb la mitjana dels valors de pH de sis repeticions per tractament  
<sup>a</sup> Es van realitzar quatre mesures de pH per cada mostra corresponents a l'extracció amb aigua destil·lada (1 i 2) i amb KCl 0.1M (3 i 4) amb una lectura al final de l'agitació de la mostra amb l'extractant (1 i 3) i al cap de 4 hores (2 i 4)  
<sup>b</sup> Les plantes es van regar durant 5 dies amb 100 ml diaris de solucions d'1.86 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup> de fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon o fosfomicina. Com a control es van regar plantes amb aigua destil·lada

**Taula 2.38.** pH del substrat de plantes de la varietat Conference regades amb diferents fosfonats

Producte <sup>1</sup>	Lectura 1 <sup>2</sup>		Lectura 2 <sup>2</sup>	
	pH (H <sub>2</sub> O) <sup>3</sup>	pH (KCl) <sup>3</sup>	pH (H <sub>2</sub> O) <sup>3</sup>	pH (KCl) <sup>3</sup>
<b>Aigua</b>	6.81 a	6.33 a	6.55 a	6.33 a
<b>Fosfomicina</b>	6.23 b	6.07 b	6.08 b	5.97 b
<b>Fosfonat potàssic</b>	5.76 c	5.58 c	5.84 b	5.49 c
<b>Fosetil-Al</b>	5.38 d	5.36 d	5.44 c	5.36 c
<b>Etefon</b>	5.32 d	5.14 e	5.15 c	5.02 d

<sup>1</sup> Les plantes es van regar durant 5 dies amb 100 ml diaris de solucions d'1.86 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup> dels fosfonats. Com a control es van regar plantes amb aigua destil·lada  
<sup>2</sup> Els valors de pH corresponen a la mitjana de sis repeticions. Per cada extractant i lectura valors de pH seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer (P=0.05)  
<sup>3</sup> Les mesures es van realitzar al final de l'agitació de la mostra de substrat amb l'extractant (lectura 1) i al cap de 4 hores (lectura 2). L'error estàndard mitjà del pH dels diferents tractaments va ser de ±0.08

En les plantes tractades amb els fosfonats es van obtenir valors de pH d'entre 5 i 6. Les plantes regades amb fosfomicina van ser les que van donar valors de pH més elevats (al voltant de 6) i les regades amb etefon més baixos (al voltant de 5). En les plantes regades amb fosetil-Al i fosfonat potàssic es van obtenir valors de pH intermedis. Per un mateix producte els valors de pH corresponents als dos extractants ( $H_2O$  i  $KCl$  0.1 M) i pels dos temps de lectura van ser similars, tot i que es van obtenir valors de pH inferiors 4 hores després de l'agitació, per qualsevol dels extractants. Per tots els productes l'extracció amb  $KCl$  va donar valors de pH lleugerament inferiors que l'extracció amb aigua destil·lada.

### 5.5. Efecte de la dosi d'aplicació de diversos fosfonats

A les Taules 2.39 i 2.40 es presenten els índexs de severitat de la infecció observats en fulles en plantes de perera de la varietat Conference regades amb fosetil-Al, fosfonat potàssic, etefon o fosfomicina a diferents concentracions i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 utilitzant la tècnica de microinfiltració localitzada en les fulles sense separar-les de la planta.

En les plantes no tractades amb fosfonats i inoculades amb el patogen es va observar una elevada freqüència de necrosis expansives des del punt d'inoculació (índex de severitat 3), tant en les fulles formades sobre el brot de l'any (joves), com en les formades sobre fusta de més d'un any (velles).

En els tractaments amb fosfonats es van observar nivells de severitat de la malaltia més elevats en les fulles joves que en les fulles velles. En les plantes tractades amb fosfonats a diferents concentracions i inoculades amb el patogen es va observar, en general, una reducció de la freqüència de necrosis progressives i un augment de la freqüència de necrosis bloquejades o limitades al punt d'inoculació. Per tots els tractaments, en augmentar la concentració de producte es va observar una disminució en el nombre d'infeccions i en la severitat. La resposta però, va ser diferent en funció del fosfonat aplicat. El fosetil-Al va ser l'únic producte que aplicat a dosis baixes (de 0.62 a 3.72 g  $HPO_3^{2-}$  l<sup>-1</sup>) no va provocar una disminució en la freqüència d'infeccions progressives, respecte les plantes no tractades amb fosfonats, en les fulles formades sobre el brot tendre. L'aplicació a la dosi més elevada (6.2 g  $HPO_3^{2-}$  l<sup>-1</sup>) va provocar una disminució en la freqüència d'infeccions, augmentant, en les fulles joves, les necrosis localitzades al punt d'inoculació (índex de severitat 1) o l'absència de necrosis (índex 0).

Per la resta de productes a totes les dosis avaluades es va observar una disminució en la freqüència de necrosis expansives respecte les plantes no tractades amb fosfonats. En les plantes regades amb fosfonat potàssic no es van observar necrosis progressives a partir del punt d'inoculació en cap dels tractaments. A les dosis de 0.62 i 1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  es va observar una elevada freqüència de necrosis bloquejades i limitades per un halo cloròtic (índex 2) i de necrosis localitzades al punt d'inoculació. En les plantes tractades amb el producte a les concentracions de 3.72 i 6.20 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  la majoria de les necrosis van quedar localitzades al punt d'inoculació o bé no es van produir necrosis. En les plantes tractades amb etefon a les dosis de 3.72 i 6.20 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  es van observar problemes de fitotoxicitat (necrosi i caiguda de les fulles). L'efecte de la fitotoxicitat va ser més accentuat en les fulles formades sobre els brots de més d'un any que en les del brot tendre. Només es van observar necrosis progressives a la dosi de 0.62 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ , amb una freqüència baixa (4%). A dosis superiors d'etefon en cas de produir-se necrosis aquestes van quedar localitzades al punt d'inoculació o bé quedaven envoltades per un halo cloròtic (1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ ). El major efecte en la reducció de la severitat de la malaltia es va observar en les plantes tractades amb fosfomicina. En aquestes plantes a cap de les dosis aplicades es va observar desenvolupament d'infeccions, la majoria de les fulles no van presentar necrosis (70-80% van presentar índex 0) i en cas d'observar-ne van quedar localitzades al punt d'inoculació. En cap cas es van observar necrosis envoltades per un halo cloròtic. En les plantes inoculades amb aigua estèril no es van observar símptomes d'infecció.

A partir dels índexs de severitat de cada microinfiltració es va calcular la severitat de la malaltia per planta amb la fórmula descrita a la pàg. 44. Els valors de severitat de la malaltia en els diferents tractaments van presentar variàncies homogènies d'acord amb la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.097$ ) i els residus es van distribuir normalment segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W= 0.98$ ,  $(P<W)=0.129$ ). L'anàlisi de la covariància va mostrar un efecte significatiu del producte i la concentració en la severitat de la malaltia (Taula 2.41). No es va observar efecte de l'experiment. Degut a això, en els càlculs estadístics posteriors es van considerar els dos experiments com a repeticions. Al haver-hi efecte de les interaccions edat de la fulla-dosi i edat de la fulla-producte, l'efecte dels diferents productes i dosis d'aplicació en la severitat de la malaltia es va avaluar pels dos tipus de fulles per separat.

Per cada tipus de fulla es va recalculer la severitat de la malaltia amb la fórmula descrita a la pàg. 44.

**Taula 2.39.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en les inoculacions de fulles en plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació amb fosfonats a diferents concentracions i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 (experiment 1)

Producte	Dosi (g HPO <sub>3</sub> <sup>2-1</sup> )	Edat de la fulla							
		Joves				Velles			
		Índex de severitat				Índex de severitat			
		0	1	2	3	0	1	2	3
<i>Control no tractat</i>		0	12	150	18	2	64	144	18
<i>Fosetil-Al</i>	<b>0.62</b>	0	0	186	18	0	62	188	2
	<b>1.86</b>	0	90	202	2	3	129	24	0
	<b>3.72</b>	0	92	159	13	22	194	12	0
	<b>6.20</b>	17	88	15	0	129	174	1	0
<i>Fosfonat potàssic</i>	<b>0.62</b>	0	108	108	0	46	150	2	0
	<b>1.86</b>	9	163	68	0	49	174	17	0
	<b>3.72</b>	60	145	11	0	72	156	0	0
	<b>6.20</b>	119	140	3	0	49	71	0	0
<i>Etefon</i>	<b>0.62</b>	20	90	92	8	58	164	12	0
	<b>1.86</b>	0	60	24	0	18	87	3	0
	<b>3.72</b>	35	13	0	0	-	-	-	-
	<b>6.20</b>	24	18	0	0	20	4	0	0
<i>Fosfomicina</i>	<b>0.62</b>	176	76	0	0	138	108	0	0
	<b>1.86</b>	123	57	0	0	168	107	0	0
	<b>3.72</b>	146	52	0	0	129	57	0	0
	<b>6.20</b>	156	30	0	0	144	66	0	0

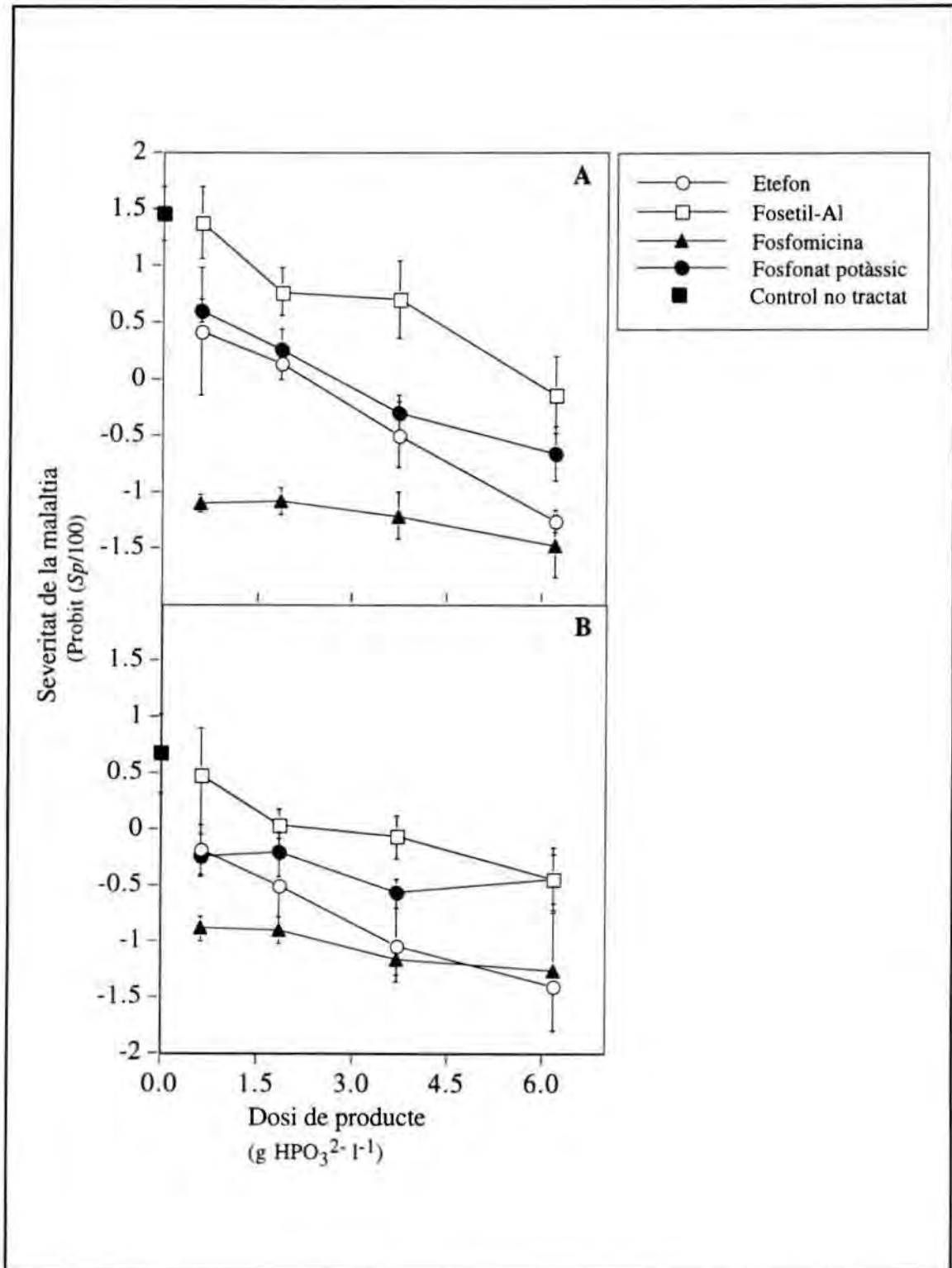
Les plantes es van regar durant 5 dies amb 100 ml diaris de solucions aquoses dels fosfonats a les diferents concentracions. Les inoculacions es van realitzar en les fulles per microinfiltració localitzada de 50 µl de suspensions de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a la dosi de 5 x 10<sup>7</sup> ufc ml<sup>-1</sup>. Es van inocular totes les fulles en la planta. En cada fulla es van realitzar 6 inoculacions amb el patògen. Els valors corresponen al total d'inoculacions de les tres repeticions per tractament que presentaven cada índex de severitat, al cap de 5 dies de la incubació de les plantes a 25 °C, 16 hores llum i 18°C, 8 hores i fosc i humitat relativa del 70-80%. Per cada tractament s'han separat els resultats de les fulles formades sobre el brot tendre de la planta i les fulles formades sobre el brot de més d'un any



**Taula 2.40.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en les inoculacions de fulles en plantes de perera de la varietat Conference tractades per irrigació amb fosfonats a diferents concentracions i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 (experiment 2)

Producte	Dosi (g HPO <sub>3</sub> <sup>2-1</sup> )	Edat de la fulla							
		Joves				Velles			
		Índex de severitat				Índex de severitat			
		0	1	2	3	0	1	2	3
<i>Control no tractat</i>		0	3	54	20	0	110	43	3
<i>Fosetil-Al</i>	<b>0.62</b>	0	45	35	6	5	181	65	0
	<b>1.86</b>	0	10	39	5	16	71	52	0
	<b>3.72</b>	0	35	36	0	11	178	43	0
	<b>6.20</b>	0	17	25	0	64	176	30	0
<i>Fosfonat potàssic</i>	<b>0.62</b>	0	6	35	1	10	216	24	0
	<b>1.86</b>	1	57	13	0	39	180	23	0
	<b>3.72</b>	0	27	27	0	135	173	1	0
	<b>6.20</b>	11	37	6	0	37	154	6	0
<i>Etefon</i>	<b>0.62</b>	23	55	11	0	21	79	14	0
	<b>1.86</b>	4	23	9	0	23	57	13	0
	<b>3.72</b>	27	21	0	0	72	66	0	0
	<b>6.20</b>	68	22	0	0	24	8	0	0
<i>Fosfomicina</i>	<b>0.62</b>	14	10	0	0	146	104	0	0
	<b>1.86</b>	30	12	0	0	121	95	0	0
	<b>3.72</b>	37	17	0	0	157	57	0	0
	<b>6.20</b>	21	21	0	0	141	54	0	0

Les plantes es van regar durant 5 dies amb 100 ml diaris de solucions aquoses dels fosfonats a les diferents concentracions. Les inoculacions es van realitzar en les fulles per microinfiltració localitzada de 50 µl de suspensions de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a la dosi de 5 x 10<sup>7</sup> ufc ml<sup>-1</sup>. Es van inocular totes les fulles en la planta. En cada fulla es van realitzar 6 inoculacions amb el patogen. Els valors corresponen al total d'inoculacions de les tres repeticions per tractament que presentaven cada índex de severitat, al cap de 5 dies de la incubació de les plantes a 25 °C, 16 hores llum i 18°C, 8 hores fosc i humitat relativa del 70-80%. Per cada tractament s'han separat els resultats de les fulles formades sobre el brot tendre de la planta i les fulles formades sobre el brot de més d'un any



**Figura 2.27.** Efecte de la concentració de diferents fosfonats en la severitat de la malaltia en fulles joves (A) i velles (B) de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94. Cada valor correspon a la mitjana de la severitat per planta de dos experiments amb tres repeticions per experiment. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana ( $P=0.05$ ).

La severitat de la malaltia en les plantes tractades amb els fosfonats a les diferents concentracions es va ser inferior a la de les plantes no tractades (Figura 2.27). Cada producte va seguir la mateixa pauta de control de la malaltia, en funció de la dosi, en els dos tipus de fulles. En general, per tots els productes es va observar una disminució de la severitat de la malaltia en augmentar la concentració de producte aplicat, essent més accentuat en les fulles joves. Els nivells de severitat en les fulles formades sobre el brot de l'any van ser superiors als de les fulles formades sobre fusta de més d'un any, per cada un dels tractaments. Les diferències van ser més grans a les concentracions de producte més baixes. La fosfomicina va ser el producte amb el que es va obtenir una major reducció de la malaltia, baixes concentracions de producte ( $0.62 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ ) van ser suficients per reduir la severitat de la malaltia en un 85 % respecte les plantes no tractades. Aquesta reducció es va mantenir per les altres concentracions de producte i en els dos tipus de fulles. El producte que va mostrar una menor reducció de la severitat de la malaltia va ser el fosetil-Al, amb una reducció de la severitat respecte les plantes no tractades d'un 10% aplicat a concentracions inferiors a  $4 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  i d'un 40 % a la concentració de  $6.20 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ , en les fulles del brot de l'any. Amb el fosfonat potàssic i l'etefon aplicats a les dosis d'1.86 i  $3.72 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  es van obtenir reduccions de la malaltia similars (40-50% de reducció respecte les plantes no tractades). A concentracions inferiors ( $0.62 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ ) o superiors ( $6.2 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ ) l'etefon va ser més eficient que el fosfonat en el control de la malaltia.

La severitat de la malaltia va presentar les variàncies homogènies d'acord amb la prova de Bartlett tant per les fulles formades sobre el brot tendre ( $(P>F)=0.074$ ) com per les fulles formades sobre fusta de més d'un any ( $(P>F)=0.089$ ) i els residus es van distribuir normalment segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.98$ ,  $(P<W)=0.547$  i  $W=0.95$ ,  $(P<W)=0.089$ , respectivament). Es va realitzar l'anàlisi de la covariància per determinar l'efecte del producte i la concentració en la severitat de la malaltia en cada tipus de fulla.

Tant en les fulles formades sobre el brot de l'any com en les formades sobre fusta de més d'un any es va obtenir un efecte significatiu del producte i la dosi de producte en la severitat de la malaltia per planta. També es va observar efecte significatiu de la interacció (Taula 2.42).

**Taula 2.41.** Efecte del tipus i dosi de fosfonat, i de l'edat de la fulla en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfonats i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
Producte	3	2494.1	4.18	0.0068
Dosi	1	8133.8	40.88	0.0000
Edat fulla <sup>a</sup>	1	227.1	1.14	0.2868
Experiment <sup>b</sup>	1	332.7	1.67	0.1975
Producte x dosi	3	1197.3	2.01	0.1146
Producte x edat	3	1779.0	2.98	0.0326
Edat x dosi	1	950.2	4.78	0.0301
Experiment x producte	3	466.4	0.78	0.5056
Experiment x dosi	1	859.4	4.32	0.0390
Experiment x edat	1	746.2	3.75	0.0543
Error	182	7799.6		

Anàlisi de la covariància realitzada amb la mitjana dels valors de severitat de la malaltia per planta de tres repeticions per tractament  
 Les plantes es van regar amb fasetil-Al, fosfonat potàssic, etefon o fosfomicina a les dosis de 0, 0.62, 1.86, 3.72 o 6.20 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>  
<sup>a</sup> Es van inocular totes les fulles en la planta per microinfiltració localitzada. Es van considerar dues edats de fulles joves i velles  
<sup>b</sup> L'experiment es va repetir dues vegades

**Taula 2.42.** Efecte del tipus i dosi de fosfonat en la severitat de la malaltia en cada edat de fulla de plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

<i>Tipus de fulla</i>	<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
<i>Joves</i>	Producte <sup>a</sup>	3	17.11	37.05	0.0000
	Dosi <sup>b</sup>	1	8.92	57.98	0.0000
	Producte x dosi	3	2.12	4.59	0.0053
	Error	100	11.23		
<i>Velles</i>	Producte <sup>a</sup>	3	3.82	6.89	0.0003
	Dosi <sup>b</sup>	1	20.52	111.00	0.0000
	Producte x dosi	3	1.70	3.07	0.0311
	Error	100	18.48		

Anàlisi de la covariància realitzada amb la mitjana dels valors de severitat de dos experiments amb tres repeticions per experiment  
<sup>a</sup> Les plantes es van regar amb fasetil-Al, fosfonat potàssic, etefon o fosfomicina a les concentracions de 0, 0.62, 1.86, 3.72 o 6.20 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>

Per cada tipus de fulla i concentració de fosfonat es va realitzar la prova de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ) de separació de mitjanes per comparar l'efecte dels diferents fosfonats en la infecció del patogen (Taula 2.43). Les variàncies dels valors de severitat dels diferents tractaments, per cada dosi i edat de la fulla, es van mostrar homogènies ( $(P>F)>0.05$ ) d'acord amb la prova de Bartlett i els residus es van distribuir de forma normal ( $W>0.80$ ,  $(P<W) >0.05$ ) segons la prova de Shapiro-Wilk.

La fosfomicina va ser el producte que a totes les concentracions utilitzades va donar valors de severitat significativament inferiors als dels altres productes, tant en les fulles formades sobre fusta de l'any com en les fulles velles. Per concentracions superiors a  $1.86 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  els nivells d'infecció obtinguts en les fulles formades sobre fusta de més d'un any en plantes tractades amb etefon no van diferir significativament dels obtinguts amb la fosfomicina. El fosetil-Al i el fosfonat potàssic aplicats a baixes concentracions ( $0.62 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ ) i a concentracions elevades ( $6.20 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ ) no van presentar diferències significatives en la severitat de la malaltia en les fulles formades sobre el brot tendre. A concentracions intermèdies ( $1.86$  i  $3.72 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ ) amb el fosfonat potàssic es van obtenir valors de severitat de la malaltia significativament inferiors als de les plantes tractades amb fosetil-Al. A aquestes concentracions l'efecte del fosfonat potàssic en la severitat de la malaltia en les fulles joves no va diferir significativament de l'etefon (Taula 2.43).

Amb els valors de severitat de la malaltia per planta ( $Sp$ ) per les fulles formades sobre el brot de l'any es van obtenir, per regressió lineal simple, les funcions que relacionen la severitat (Probit ( $Sp/100$ )) amb la concentració de producte. Es va obtenir una funció per cada repetició i tractament. Els residus van presentar distribució normal segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W>0.80$ ,  $(P<W) >0.05$ ).

Amb les funcions que van mostrar bon ajust ( $(P>F)<0.05$  i  $R^2>0.5$ ) es van calcular les concentracions de producte necessàries per reduir la severitat de la malaltia en un 50% ( $DE_{50}$ ) i en un 90% ( $DE_{90}$ ) respecte les plantes no tractades amb fosfonats (Taula 2.44). Els valors de  $DE_{50}$  i de  $DE_{90}$  dels diferents tractaments van presentar les variàncies homogènies segons la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.519$  i  $(P>F)=0.657$ , respectivament) i els residus es van distribuir de forma normal ( $W=0.94$ ,  $(P<W)=0.321$  i  $W=0.93$ ,  $(P<W)=0.317$ ). Es van comparar les  $DE_{50}$  i  $DE_{90}$  dels diferents productes amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer (Taula 2.44).

**Taula 2.43.** Severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en funció del tipus i dosi de fosfonat

Tipus de fulla	Producte <sup>z</sup>	Severitat de la malaltia <sup>x</sup>				
		Dosi de fosfonat (g HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> l <sup>-1</sup> )				
		0.00	0.62	1.86	3.72	6.20
Joves	Control no tractat	90.17	-	-	-	-
	Fosetil-Al	-	86.1 a	81.4 a	79.2 a	54.1 a
	Fosfonat potàssic	-	75.2 a	56.1 b	38.1 b	36.2 ab
	Etefon	-	59.2 a	55.0 b	32.1 b	15.4 b c
	Fosfomicina	-	14.2 b	14.2 c	11.4 c	12.2 c
Velles	Control no tractat	75.51	-	-	-	-
	Fosetil-Al	-	74.1 A	57.0 A	52.1 A	37.2 A
	Fosfonat potàssic	-	45.2 B	47.1 AB	32.5 B	37.4 A
	Etefon	-	47.2 B	36.1 B	18.7 C	9.1 B
	Fosfomicina	-	21.1 C	20.3 C	14.2 C	13.5 B

<sup>x</sup> Els valors corresponen a la mitjana de la severitat de la malaltia de dos experiments amb tres repeticions per experiment. Per una mateixa concentració de producte valors de severitat seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives segons la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ ) realitzada amb els valors de severitat ( $S_p$ ) transformats en Probit ( $S_p/100$ )

<sup>z</sup> Les plantes es van regar durant cinc dies amb els productes i es van inocular les fulles amb 50 µl de suspensions del patogen a la dosi de  $5 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup>

**Taula 2.44.** Dosi efectiva mitjana (DE<sub>50</sub>) i del 90% (DE<sub>90</sub>) pels diferents fosfonats en el control de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference

Tractament <sup>x</sup>	Dosi efectiva (g HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> l <sup>-1</sup> ) <sup>z</sup>	
	DE <sub>50</sub>	DE <sub>90</sub>
Fosetil-Al	5.42 a	10.14 A B
Fosfonat potàssic	2.92 b	11.62 A
Etefon	1.47 c	7.60 B C
Fosfomicina	<0.50 c	4.77 C

<sup>x</sup> Les plantes es van tractar amb solucions dels fosfonats a diferents dosis (Taula 2.40).

<sup>z</sup> Valors calculats a partir de les equacions obtingudes per regressió lineal simple de la severitat de la malaltia (Probit ( $S_p/100$ )) i la dosi de fosfonat per cada una de les repeticions de cada tractament. Els valors representen la mitjana de dos experiments amb tres repeticions per experiment. Valors seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives d'acord amb la prova de separació de mitjanes de Tukey-Kramer ( $P=0.05$ )

Es va observar diferent eficàcia en la reducció de la severitat de la malaltia dependent del fosfonat (Taula 2.44). El fosetil-Al es va mostrar com el producte menys efectiu, en presentar la  $DE_{50}$  més elevada, seguit del fosfonat potàssic, amb una eficàcia moderada. La fosfomicina i l'etefon es van mostrar com els productes més actius amb  $DE_{50}$  baixes. Per reduir la severitat de la malaltia en un 90 % el fosetil-Al i el fosfonat potàssic es van mostrar poc efectius, amb concentracions elevades ( $DE_{90}$  superior a 10 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$ ), l'etefon va ser mitjanament eficaç i la fosfomicina va ser el més eficaç amb una  $DE_{90}$  inferior a la  $DE_{50}$  del fosetil-Al.

### 5.6. Efecte de la cadència d'aplicació dels fosfonats

Per determinar l'efecte de la freqüència d'aplicació dels fosfonats es van regar plantes de perera de la varietat Conference amb 100 ml diaris de solucions de fosetil-Al, fosfonat potàssic o etefon a la dosi d'1.86 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  durant 3, 6 o 9 dies. Com a control es van regar plantes amb aigua destil·lada amb la mateixa cadència dels fosfonats. Al final de cada tractament es van inocular totes les fulles en la planta per microinfiltració localitzada amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 a la dosi de  $5 \times 10^7$  ufc  $ml^{-1}$ . Al cap de 5 dies es va avaluar la presència o absència d'infeccions i la severitat de la infecció en cada una de les microinfiltracions, utilitzant els índexs de severitat descrits a la Taula 1.5. La freqüència dels índexs de severitat pels diferents tractaments es presenta a la Taula 2.45.

En les plantes control, regades amb aigua i inoculades amb el patogen es va observar una elevada freqüència d'infeccions progressives per la superfície de la fulla a partir del punt d'inoculació (més del 90%). No es van observar diferències en la sensibilitat de les plantes al patogen al llarg de l'experiment ja que per totes les cadències (0, 3, 6 i 9 dies) les plantes regades amb aigua i inoculades amb el patogen van mostrar nivells de severitat similars (Taula 2.45). En les plantes inoculades amb aigua estèril no es van observar símptomes d'infecció.

En les plantes tractades amb fosfonats i inoculades amb el patogen es va observar una disminució de necrosis expansives i un augment de necrosis bloquejades o localitzades al punt d'inoculació. Per tots els productes en augmentar la freqüència de les aplicacions es va produir una disminució en les infeccions progressives. Els nivells de malaltia obtinguts per cada cadència d'aplicació van ser diferents en funció del producte.

**Taula 2.45.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció en inoculacions en fulles de plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfonats amb diferents cadències d'irrigació i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

Producte	Cadència d'aplicació (dies)	Tipus de fulles							
		Joves				Velles			
		Índex de severitat				Índex de severitat			
		0	1	2	3	0	1	2	3
<i>Control no tractat</i> (aigua)	0	0	0	0	84	0	2	4	228
	3	0	0	9	111	0	0	38	256
	6	0	0	14	142	0	0	29	253
	9	0	0	8	118	0	0	17	217
<i>Fosetil-Al</i>	3	0	11	14	59	0	29	62	113
	6	0	0	32	58	0	13	102	83
	9	0	4	14	6	9	79	71	33
<i>Fosfonat potàssic</i>	3	0	6	11	61	0	40	88	118
	6	0	4	29	63	0	34	126	92
	9	0	8	11	5	3	68	79	24
<i>Etefon</i>	3	0	0	17	121	0	0	3	63
	6	5	43	59	1	8	116	110	0
	9	10	47	9	0	50	136	49	0

Les plantes es van regar durant 3, 6 o 9 dies amb 100 ml diaris de solucions aquoses dels fosfonats a la concentració d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  l<sup>-1</sup>. Com a control es van regar plantes amb aigua destil·lada. Les inoculacions es van realitzar en les fulles sense separar-les de la planta, per microinfiltració localitzada de 50 µl de suspensions de la soca EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* a la dosi de  $5 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup>. Es van inocular totes les fulles de cada planta. En cada fulla es van realitzar 6 inoculacions amb el patogen. Els valors corresponen al total d'inoculacions de totes les fulles de les tres repeticions de cada tractament que van presentar cada índex de severitat, al cap de 5 dies de la incubació de les plantes inoculades a 25 °C, 16 hores llum i 18°C, 8 hores fosc i humitat relativa de 70-80%. Per cada tractament s'han separat els resultats de les fulles formades sobre el brot tendre de la planta (joves) i les fulles formades sobre brots de més d'un any (velles)



Per un mateix producte i cadència la freqüència dels índexs de severitat de la infecció va ser similar en les fulles joves i les fulles velles de les plantes. En les plantes tractades amb fosetil-Al i fosfonat potàssic durant 3, 6 i 9 dies es van observar necrosis progressives amb una freqüència del 60-70%, 40-60% i 15-25% respectivament. En les plantes tractades amb etefon durant 3 dies es van obtenir freqüències dels índexs de severitat similars a les plantes tractades amb els altres fosfonats durant el mateix període, mentre que en les plantes regades amb etefon durant 6 i 9 dies es van observar nivells de malaltia inferiors als dels altres productes, amb absència de necrosis expansives (<1%) i un augment de necrosis bloquejades o localitzades al punt d'inoculació.

A partir dels índexs de severitat es va calcular la severitat de la malaltia en cada tractament i repetició amb la fórmula descrita a la pàg. 162. Les variàncies de la severitat de la malaltia dels diferents tractaments no es van mostrar homogènies d'acord amb la prova de Bartlett ( $(P>F)<0.05$ ) i els residus no es van distribuir normalment segons la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.92$ ,  $(P<W)=0.001$ ). No considerant les plantes control (no tractades amb fosfonats), les variàncies dels valors de severitat dels diferents tractaments es van mostrar homogènies ( $(P>F)=0.178$ ) i els residus es van distribuir de forma normal ( $W=0.92$ ,  $(P<W)=0.061$ ). L'anàlisi de la covariància es va realitzar per tant, sense incloure les plantes no tractades i inoculades amb el patogen.

Es va observar un efecte molt significatiu de la cadència d'aplicació dels fosfonats en la severitat de la malaltia. El tipus de fosfonat aplicat i l'edat de la fulla no van mostrar un efecte significatiu en la severitat de la malaltia (Taula 2.46). Al no haver-hi efecte de l'edat de la fulla es va recalculer la severitat de la malaltia per planta amb la fórmula descrita a la pàg. 162 considerant totes les fulles de la planta (Figura 2.28).

La severitat de la malaltia va disminuir en augmentar la cadència d'aplicació dels fosfonats (Figura 2.28). En les plantes tractades amb etefon la disminució de la severitat de la malaltia en augmentar la freqüència de les aplicacions va ser lineal, amb una màxima reducció en les plantes tractades durant 9 dies. Amb els altres productes la severitat de la malaltia va disminuir linealment en augmentar la cadència fins als 6 dies. El tractament de les plantes diàriament durant més de 6 dies amb fosetil-Al o fosfonat potàssic no va suposar una reducció en la severitat de la malaltia. En les plantes tractades durant 3 dies amb els fosfonats es va obtenir una reducció en la severitat de la malaltia, respecte les plantes no tractades, d'un 15-25%, en les regades durant 6 dies amb fosfonats la severitat va disminuir en un 50 % aproximadament i en les regades durant 9 dies en un 50-70% segons els productes.

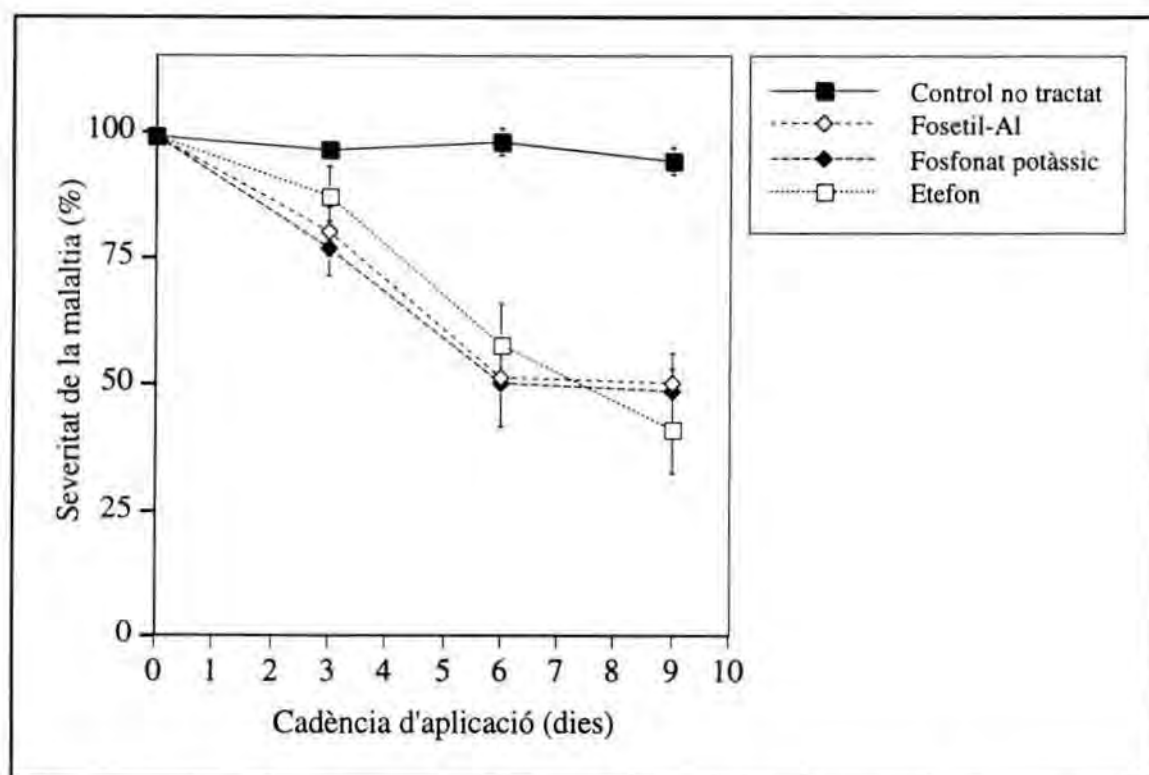
**Taula 2.46.** Efecte de la cadència d'aplicació de diferents fosfonats en la severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

Font de variació	Graus de llibertat	Suma de quadrats	F	P>F
Producte <sup>a</sup>	2	186.81	0.64	0.5325
Cadència d'aplicació <sup>a</sup>	1	5695.34	39.08	0.0000
Edat de la fulla <sup>b</sup>	1	98.39	0.67	0.4165
Producte x cadència	2	569.48	1.95	0.1561
Producte x edat fulla	2	360.70	1.24	0.3018
Cadència x edat fulla	1	0.24	0.01	0.9681
Error	44	5392.02		

Anàlisi de la covariància realitzada amb els valors de severitat de la malaltia de tres repeticions per tractament

<sup>a</sup> Les plantes es van regar diàriament amb fosetil-Al, fosfonat potàssic o etefon a la dosi d'1,86 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup> amb una cadència de 3, 6 o 9 dies

<sup>b</sup> Per cada planta s'han diferenciat els dos tipus de fulla (joves i velles)



**Figura 2.28.** Efecte de la cadència d'aplicació dels fosfonats en la severitat de la malaltia en inocular *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 en plantes de perera de la varietat Conference. Les plantes es regaven diàriament durant 3, 6 o 9 dies amb cada producte a la dosi d'1,86 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>. Com a control es van regar plantes amb aigua destil·lada. Els valors corresponen a la mitjana de la severitat de la malaltia per planta de tres repeticions per cada tractament. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana ( $P=0.05$ ).

Per cada cadència d'aplicació es va determinar l'efecte del producte (incloent el control no tractat) en la severitat de la malaltia mitjançant l'anàlisi de la variància i la separació de mitjanes. La severitat de la malaltia dels diferents tractaments per cada cadència (3, 6 i 9 dies) va presentar les variàncies homogènies d'acord amb la prova de Bartlett ( $(P>F)=0.068, 0.267$  i  $0.449$ , respectivament) i els residus es van distribuir de forma normal d'acord amb la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.98, (P<W)=0.974$  ;  $W=0.95, (P<W)=0.659$  i  $W=0.93, (P<W)=0.358$ , respectivament).

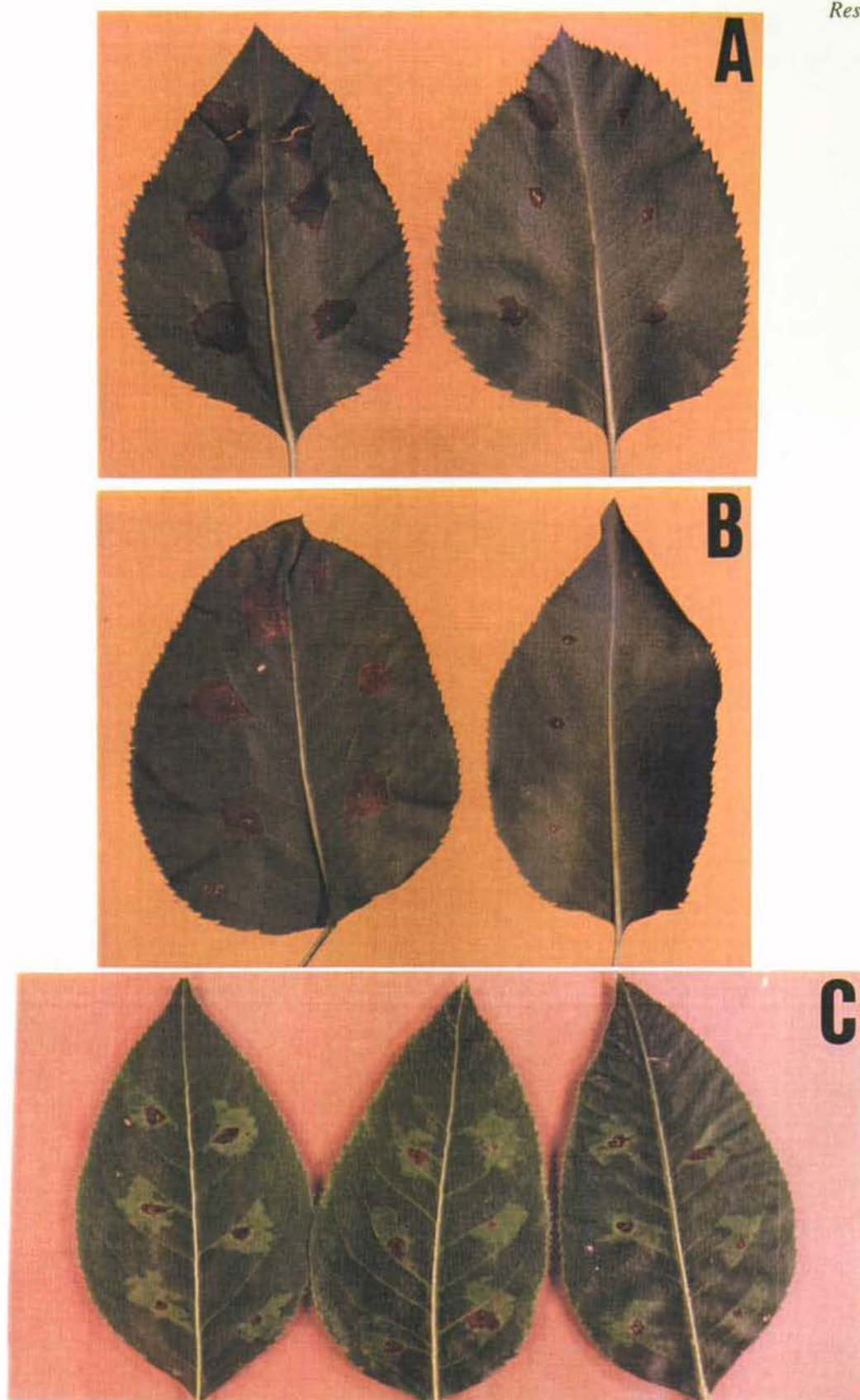
En les plantes tractades durant tres dies amb els diferents fosfonats i inoculades amb els patogen no es van observar diferències significatives en la severitat de la malaltia entre productes, ni respecte les plantes no tractades amb fosfonats i també inoculades amb el patogen ( $(P>F)>0.05$ ), (Taula 2.47). Tant en les plantes tractades durant 6 dies com en les tractades durant 9 dies amb els fosfonats es va observar un efecte significatiu del tractament ( $R^2>0.80$ ;  $(P>F)<0.01$ ). No es van observar diferències significatives entre productes, però si entre les no tractades amb fosfonats i les tractades, segons la prova de Tukey-Kramer de separació de mitjanes (Taula 2.47).

**Taula 2.47.** Severitat de la malaltia en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb fosfonats amb diferents cadències i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94

Producte <sup>a</sup>	Cadència d'aplicació		
	3 dies	6 dies	9 dies
<i>Control no tractat</i>	95.9 a	97.6 a	93.7 a
<i>Fosetil-Al</i>	79.8 a	51.4 b	50.3 b
<i>Fosfonat potàssic</i>	76.5 a	50.0 b	48.3 b
<i>Etefon</i>	86.8 a	57.5 b	41.0 b

<sup>a</sup> Les plantes es van regar amb 100 ml diaris de solucions d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}\text{l}^{-1}$  de fosetil-Al, fosfonat potàssic o etefon, durant 3, 6 o 9 dies i es van inocular per microinfiltració localitzada en les fulles amb el patogen. Com a control no tractat es van regar plantes amb aigua amb la mateixa cadència que amb els productes

<sup>b</sup> La severitat es va avaluar al cap de 5 dies de la incubació de les plantes. Cada valor correspon a la mitjana de la severitat de la malaltia de tres repeticions per tractament. Per cada cadència d'aplicació valors de severitat seguits per la mateixa lletra no presenten diferències significatives d'acord amb la prova de Tukey-Kramer de separació de mitjanes ( $P=0.05$ )



**Figura 2.29.** Síntomes de la inoculació de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 per microinfiltració localitzada en fulles en plantes de perera de la varietat Conference tractades amb diferents fosfonats a la dosi d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  l<sup>-1</sup>. A, esquerra control no tractat, dreta tractat amb fosetil-Al. B, esquerra control no tractat, dreta tractat amb etefon. C, fulles del brot tendre de plantes tractades amb fosfonat potàssic.

### 5.7. Efecte del fosetil-Al aplicat a camp en pereres de diferents varietats

A la Taula 2.48 es presenta la freqüència dels índexs de severitat de la infecció (descrits a la Taula 2.6) obtinguts en inocular les soques EPS94 i EPS17a de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles d'arbres de diferents varietats de perera tractats amb fosetil-Al. Per la majoria de varietats es va obtenir una major freqüència d'absència d'infeccions o d'infeccions limitades al punt d'inoculació en les fulles dels arbres tractats amb fosetil-Al que en les fulles dels arbres no tractats. En els arbres tractats en cas de produir-se infeccions, van progressar pel nervi principal de la fulla, i en les varietats Comice, Conference i General Leclerc es van observar infeccions progressives per la fulla. En les fulles dels arbres no tractats es va observar una major freqüència d'infeccions progressives pels nervis o la superfície de la fulla, de forma més accentuada en les fulles inoculades amb la soca EPS94.

**Taula 2.48.** Freqüència dels índexs de severitat de la infecció (*Is*), en funció del tractament amb fosetil-Al, en fulles de pereres de diferents varietats inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae*

Varietat	Tractat <sup>a</sup>					No tractat <sup>a</sup>														
	soca <sup>b</sup> EPS17a		soca <sup>b</sup> EPS94			soca <sup>b</sup> EPS17a		soca <sup>b</sup> EPS94												
	<i>Is</i> <sup>c</sup>					<i>Is</i> <sup>c</sup>														
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4					
Alexandrine	0	3	3	3	0	2	2	2	3	0	0	0	3	6	0	0	0	4	5	0
B. Anjou	2	2	5	0	0	1	8	0	0	0	0	1	6	2	0	0	2	7	0	0
B. Hardent Point	2	7	0	0	0	0	8	1	0	0	0	9	0	0	0	0	7	2	0	0
Blanquilla	4	4	1	0	0	4	4	1	0	0	1	5	3	0	0	1	8	0	0	0
Comice	1	3	4	1	0	2	1	4	2	0	0	2	7	0	0	1	3	3	2	0
Conference	1	1	7	0	0	0	0	6	3	0	0	2	7	0	0	0	0	3	6	0
General Leclerc	1	4	2	2	0	0	0	3	5	1	0	3	3	3	0	0	1	1	2	5
Magness	0	4	5	0	0	0	8	0	1	0	0	2	5	2	0	0	7	1	1	0
Maxine	2	4	2	1	0	3	6	0	0	0	0	3	3	3	0	1	6	1	1	0
Passe Crassane	2	6	1	0	0	2	4	3	0	0	1	2	5	1	0	0	4	5	0	0
Williams	1	5	3	0	0	0	8	1	0	0	0	3	5	1	0	0	7	1	1	0
Winter Nellis	7	2	0	0	0	7	2	0	0	0	3	6	0	0	0	1	8	0	0	0

<sup>a</sup> Els arbres es van tractar amb fosetil-Al per aplicació foliar i radicular durant els quinze dies previs a les inoculacions. L'aplicació per via radicular es va realitzar dues vegades (cadència setmanal) amb solucions d'1.86 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>, aplicant cada vegada 3 l de solució per arbre. Per via foliar es van realitzar tres aplicacions, dues coincidint amb les radiculars, i una tercera el dia anterior a les inoculacions. En cada aplicació es van polvoritzar 1 l de solucions d'1.86 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup> per arbre. Per cada varietat es van tractar 5 arbres amb fosetil-Al i 5 es van deixar sense tractar (control no tractat)

<sup>b</sup> Es van inocular les fulles del brot tendre dels arbres, separades dels arbres, dipositant 20 µl de suspensions d'1-5 x 10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup> de cada soca sobre una ferida realitzada en el nervi principal. Per cada varietat i tractament es van inocular 9 fulles amb cada soca de *P. syringae* pv. *syringae*

<sup>c</sup> La severitat de la infecció es va avaluar a les 48 h de la incubació de les fulles inoculades a 25°C i 16 h llum i 18°C i 8 h fosc i humitat relativa superior al 90%. Per cada índex de severitat la freqüència correspon al nombre de fulles de cada tractament que van presentar l'índex

A partir de les freqüències dels índexs de severitat en inoculacions en fulles separades, es va obtenir un model loglineal per relacionar la freqüència de cada índex de severitat amb els diferents factors (varietat, soca i tractament), mitjançant el mètode de modelització de dades categòriques de màxima versemblança. En obtenir un model amb bon ajust, encara que amb una component d'error elevada (Taula 2.49), es va utilitzar aquest model per avaluar l'efecte de la varietat, soca, tractament amb fosepil-Al i les interaccions en la severitat de la infecció (Taula 2.50).

Es va observar un efecte significatiu de la varietat de perera i del tractament amb fosepil-Al en la severitat de la infecció. No es va observar efecte significatiu de la soca de patogen, però sí de la interacció varietat-soca.

**Taula 2.49.** Ajust del model obtingut per relacionar la severitat de la infecció en fulles d'arbres de diferents varietats de perera, amb la varietat de perera, la soca de *P. syringae* pv. *syringae* i el tractament amb fosepil-Al

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>-Logversemblança</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Model	36	149.46	298.92	0.0000
Error	395	415.34		

Model loglineal obtingut a partir de les freqüències observades de cada un dels índexs de severitat per cada tractament (Taula 2.48)

**Taula 2.50.** Efecte del tractament amb fosepil-Al en la severitat de la infecció en fulles d'arbres de diferents varietats, en funció de la varietat de perera i la soca de *P. syringae* pv. *syringae*

<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Tractament <sup>a</sup>	1	48.26	0.0000
Varietat <sup>b</sup>	11	174.93	0.0000
Soca <sup>b</sup>	1	0.04	0.8371
Varietat x soca	11	57.22	0.0000
Varietat x tractament	11	13.55	0.2589
Soca x tractament	1	0.20	0.6505

Anàlisi realitzada amb el model loglineal obtingut per relacionar l'índex de severitat amb la varietat, soca i el tractament

<sup>a</sup> Es van tractar arbres de 12 varietats de perera amb fosepil-Al. Com a control es van utilitzar arbres de les mateixes varietats no tractats

<sup>b</sup> Es van inocular les fulles del brot tendre separades dels arbres amb les soques EPS17a i EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae*. Per cada varietat i soca es van inocular 9 fulles

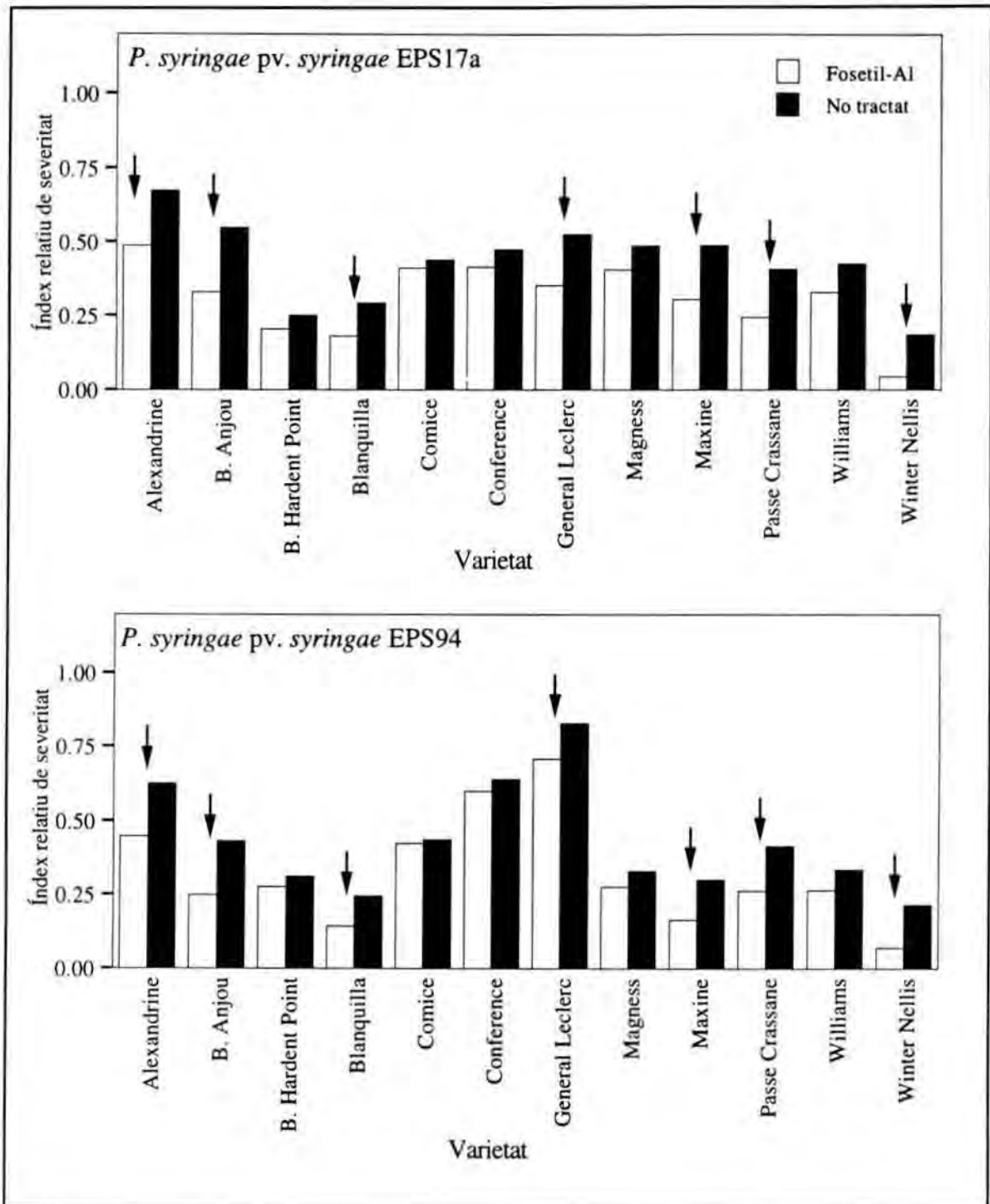
**Taula 2.51.** Efecte de la soca de patogen i del tractament amb fosetil-Al en la severitat de la infecció en inocular *P. syringae* pv. *syringae* en fulles d'arbres de diferents varietats de perera tractats a camp

	<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	$\chi^2$	$P > \chi^2$
<i>Hardent Point</i>	Soca <sup>a</sup>	1	0.01	0.9434
	Tractament <sup>b</sup>	1	0.01	0.9536
	Soca x tractament	1	0.01	0.9597
<i>Alexandrine</i>	Soca <sup>a</sup>	1	0.50	0.4774
	Tractament <sup>b</sup>	1	5.95	0.0147
	Soca x tractament	1	0.01	0.9134
<i>B. Anjou</i>	Soca <sup>a</sup>	1	4.09	0.0432
	Tractament <sup>b</sup>	1	10.71	0.0011
	Soca x tractament	1	0.01	0.9963
<i>Blanquilla</i>	Soca <sup>a</sup>	1	0.71	0.3996
	Tractament <sup>b</sup>	1	3.98	0.0459
	Soca x tractament	1	0.71	0.3996
<i>Comice</i>	Soca <sup>a</sup>	1	0.03	0.8622
	Tractament <sup>b</sup>	1	0.04	0.8345
	Soca x tractament	1	0.24	0.6222
<i>Conference</i>	Soca <sup>a</sup>	1	0.01	0.9019
	Tractament	1	1.03	0.3107
	Soca x tractament	1	0.68	0.4087
<i>General Leclerc</i>	Soca <sup>a</sup>	1	12.09	0.0005
	Tractament <sup>b</sup>	1	3.43	0.0641
	Soca x tractament	1	0.21	0.6486
<i>Magness</i>	Soca <sup>a</sup>	1	6.69	0.0097
	Tractament <sup>b</sup>	1	1.42	0.2324
	Soca x tractament	1	0.02	0.8732
<i>Maxine</i>	Soca <sup>a</sup>	1	5.21	0.0224
	Tractament <sup>b</sup>	1	5.13	0.0235
	Soca x tractament	1	0.05	0.8170
<i>Passe Crassane</i>	Soca <sup>a</sup>	1	0.01	0.9219
	Tractament <sup>b</sup>	1	6.15	0.0132
	Soca x tractament	1	0.75	0.3877
<i>Williams</i>	Soca <sup>a</sup>	1	2.29	0.1296
	Tractament <sup>b</sup>	1	2.42	0.1195
	Soca x tractament	1	0.44	0.5090
<i>Winter Nellis</i>	Soca <sup>a</sup>	1	0.66	0.4165
	Tractament <sup>b</sup>	1	9.57	0.0020
	Soca x tractament	1	0.66	0.4165

Anàlisi realitzada amb els models loglineals obtinguts per cada varietat per predir l'índex de severitat en funció de la soca de patogen i el tractament amb fosetil-Al

<sup>a</sup> Es van inocular fulles separades dels arbres amb les soques EPS17a i EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae*

<sup>b</sup> Es van realitzar tractaments a camp aplicant fosetil-Al per via foliar i per via radicular



**Figura 2.30.** Severitat de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles d'arbres de diferents varietats de perera en funció del tractament amb fosetil-Al. El fosetil-Al es va aplicar a camp en arbres de diferents varietats per via foliar (tres polvoritzacions amb cadència setmanal aplicant 1 l a la dosi d' $1.86 \text{ g HPO}_3^2 \text{ l}^{-1}$  per arbre) i per via radicular (dues aplicacions de 3 l a la mateixa dosi amb cadència setmanal). Per cada varietat i tractament es van inocular 9 fulles dipositant  $20 \mu\text{l}$  de suspensions d' $1-5 \times 10^8 \text{ ufc ml}^{-1}$  de cada soca sobre una ferida. La severitat de la malaltia es va avaluar a les 48h de la incubació a  $25^\circ\text{C}$ , 16 h llum i  $18^\circ\text{C}$ , 8 h fosc i humitat relativa superior al 90 %.

Per cada varietat, soca i tractament l'índex relatiu de severitat es va calcular dividint l'índex de severitat predit pels diferents models loglineals per l'índex de severitat màxim ( $I_s=3$ ). Amb una fletxa s'indiquen les varietats en les que es va observar un efecte significatiu del tractament amb fosetil-Al en la reducció de la severitat de la malaltia.



En observar un efecte significatiu de la varietat en la severitat de la infecció es van obtenir models loglineals per relacionar la freqüència dels índexs de severitat amb la soca de patogen i el tractament per cada una de les varietats de perera. Els models obtinguts van presentar un bon ajust ( $(P > \chi^2) < 0.05$  per totes les varietats) i, per tant, es van utilitzar per determinar l'efecte del tractament amb fosetil-Al i de la soca de patogen en la severitat de la infecció per cada varietat (Taula 2.51).

Es va observar un efecte significatiu del tractament amb fosetil-Al en la reducció de la severitat de la malaltia en les varietats Alexandrine, Blanquilla, B. Anjou, General Leclerc (en el límit), Maxine, Passe Crassane i Winter Nellis. En aquestes varietats el tractament amb fosetil-Al va provocar una reducció significativa dels nivells de severitat de la malaltia en inocular-les amb *P. syringae* pv. *syringae*, respecte els arbres no tractats (Figura 2.30). En algunes varietats (B. Anjou, General Leclerc, Magness i Maxine) es va observar un efecte significatiu de la soca de patogen en la severitat de la malaltia. En les varietats Conference, Williams i B. Hardent Point no es va observar efecte significatiu de cap dels factors en la severitat de la infecció.

## 6. Activitat antibacteriana *in vitro* dels fosfonats

### 6.1. Inhibició del creixement bacterià per la incorporació dels fosfonats en medi sòlid

L'efecte del fasetil-Al, fosfonat potàssic, etefon, fosfomicina i estreptomicina, en el creixement de diferents soques d'espècies de bacteris fitopatògens i no fitopatògens es mostra a la Taula 2.52. En aquesta taula s'indica la concentració mínima de producte que inhibeix el creixement bacterià (CMI) en medi CYE. El contingut en fosfats d'aquest medi determinat segons el mètode de Cottenie i col. (1979) va ser de  $0.028 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ ml}^{-1}$ .

**Taula 2.52.** Concentració mínima inhibidora del creixement de diferents bacteris per l'estreptomicina (Str), fosfomicina (Fmc), fosfonat potàssic (Fs K), fasetil-Al (F Al) i etefon (Etf) en medi CYE

Bacteri	Producte <sup>a</sup>				
	Str	Fmc	Fs K	F Al	Etf
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<0.5	16-32	nd <sup>b</sup>	>634 <sup>c</sup>	317-634
<i>Erwinia amylovora</i>	0-2	16-40	>634	317-634	317-634
<i>E. herbicola</i>	8-16	>80	>634	317-634	80-158
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	16-32	20-40	>634	158-317	40-80
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	<0.5	1-2	nd	>634	>634
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<0.5	64-128	nd	>634	>634
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1-2	10-20	>634	317-634	317-634
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<0.5	4-8	nd	>634	>634
<i>P. viridiflava</i>	0.5-1	20-40	>634	158-317	317-634
<i>Xanthomonas</i> spp.	2-16	2.5-20	>634	317-634	317-634

<sup>a</sup> Les concentracions s'expressen en  $\mu\text{g HPO}_3^{2-} \text{ ml}^{-1}$  pels fosfonats i en  $\mu\text{g i.a. ml}^{-1}$  per l'estreptomicina. Corresponen a la mínima concentració de cada producte (CMI) a la que no es va observar creixement bacterià al cap de 5 dies d'incubació a 25 °C. Per cada una de les espècies s'ha indicat l'interval o valor de CMI per les diferents soques

<sup>b</sup> no determinat (nd)

<sup>c</sup> Concentració màxima avaluada

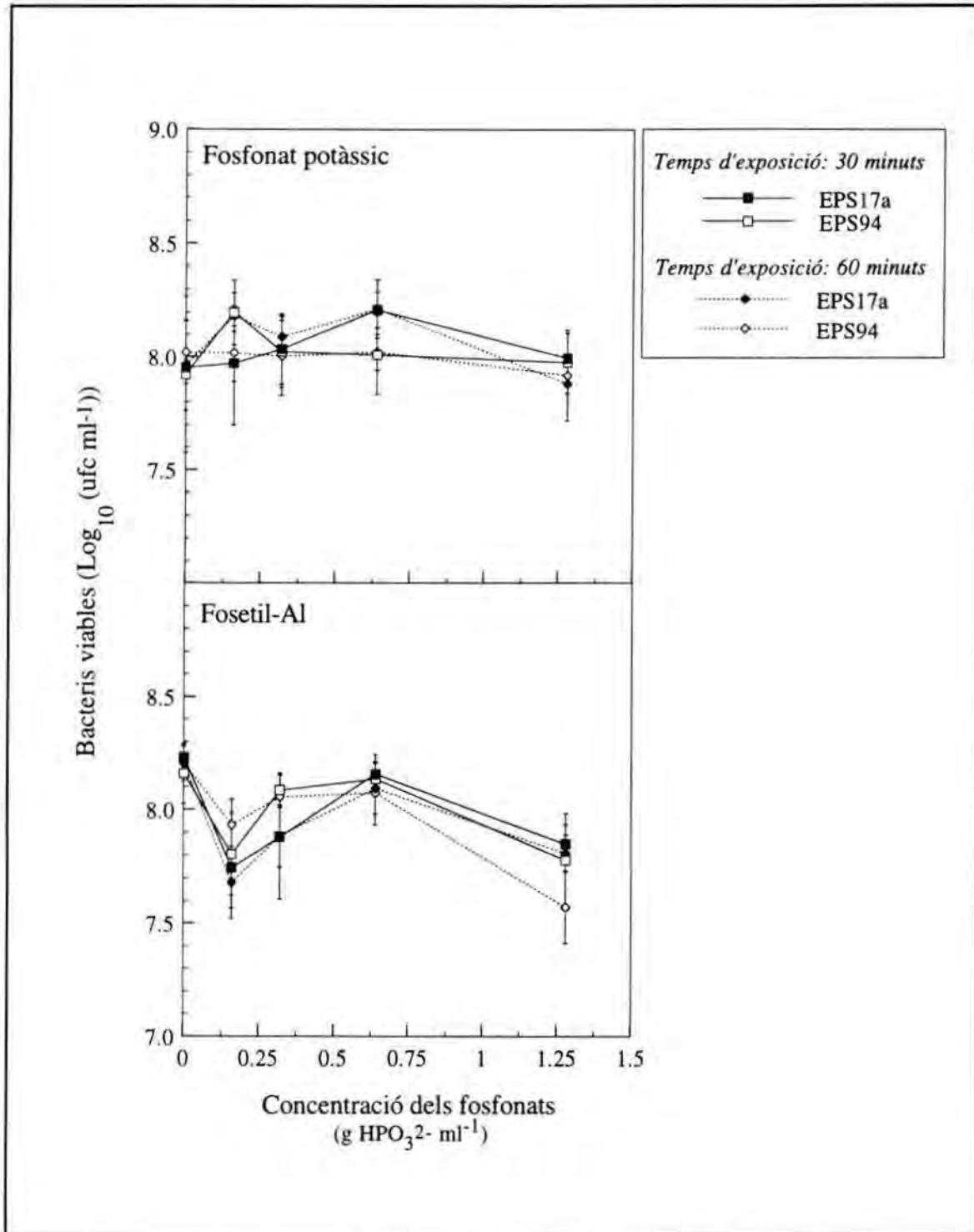
A la Taula 2.52 s'observa que l'activitat antibacteriana del fosfonat potàssic, fosetil-Al i etefon va ser molt baixa per tots els bacteris avaluats. El fosfonat potàssic es va mostrar com el producte menys actiu en la inhibició del creixement bacterià ja que la CMI era superior a  $0.63 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ . En 20 de les 26 soques bacterianes avaluades el fosetil-Al va presentar una CMI superior a  $0.32 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  i l'etefon en 24 de les 26 soques. La fosfomicina, en canvi, va mostrar una activitat antimicrobiana *in vitro* més elevada que la resta de fosfonats ja que les CMI eren d'entre  $2.5$  i  $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ . En general, tots els fosfonats van mostrar una activitat antimicrobiana baixa en comparació amb l'estreptomicina.

El pH del medi CYE, utilitzat per a l'avaluació de l'activitat antimicrobiana *in vitro* dels fosfonats, va ser diferent segons el producte i la dosi (Figura 2.32). El medi CYE amb etefon i amb fosetil-Al afegits a diferents concentracions, va presentar caràcter àcid (valors d'entre 2 i 3 per l'etefon i entre 3 i 4 pel fosetil), amb una disminució del pH en augmentar la dosi de producte. El pH del medi amb fosfonat potàssic es va mantenir força constant a les diferents concentracions del producte amb pH d'entre 6.5 i 7, mentre que per la fosfomicina el medi va presentar caràcter bàsic amb valors de pH de 7 a 8.5, augmentant el pH en augmentar la concentració de producte. Els valors de pH del medi CYE a les CMI determinades pels diferents productes van ser de 2.8 per l'etefon, 3.7 pel fosetil-Al, 6.5 pel fosfonat potàssic i 7.5 per la fosfomicina.

## 6.2. Supervivència de *P. syringae* pv. *syringae* en solucions aquoses de fosfonats

Les dues soques de *P. syringae* pv. *syringae* utilitzades (EPS94 i EPS17a) van mostrar relativament bona supervivència tant en solucions de fosetil-Al com de fosfonat potàssic a diferents concentracions, pels dos temps d'exposició avaluats (30 i 60 minuts) (Figura 2.31).

Les variàncies de les concentracions de bacteris viables pels diferents tractaments es van mostrar homogènies tant en les suspensions amb fosetil-Al ( $(P>F)= 0.064$ ) com amb fosfonat potàssic ( $(P>F)= 0.085$ ) i els residus van seguir una distribució normal d'acord amb la prova de Shapiro-Wilk ( $W=0.96$ ,  $(P<W)=0.114$ ;  $W=0.98$ ,  $(P<W)=0.615$ , respectivament).



**Figura 2.31.** Supervivència de les soques EPS17a i EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* exposades durant 30 o 60 minuts a solucions de fosfonat potàssic i fosetil-Al de diferents concentracions. Cada valor és la mitjana de tres repeticions. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana ( $P=0.05$ ).

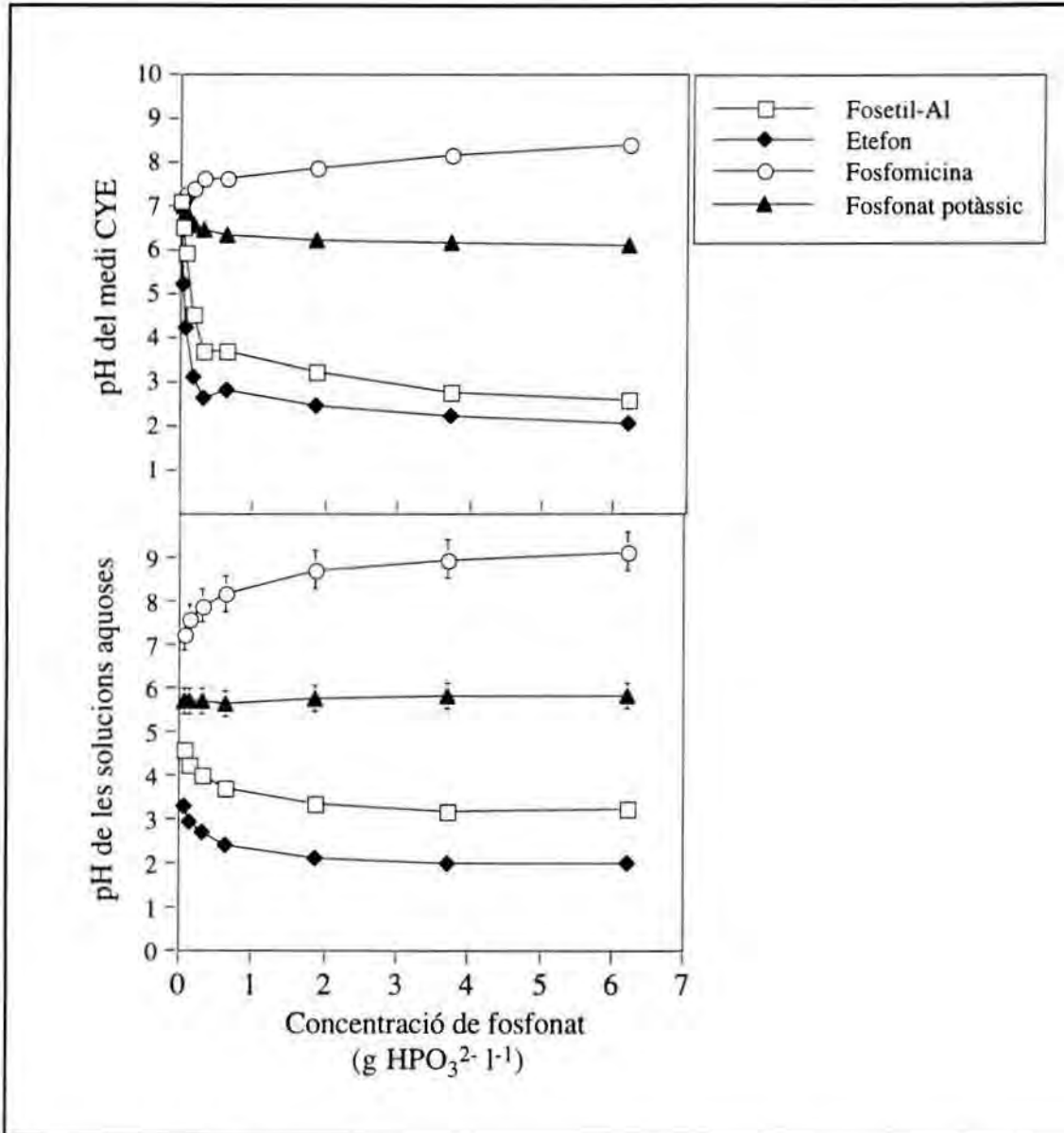
**Taula 2.53.** Efecte de la concentració de fosfonat, de la soca bacteriana i del temps d'exposició en la supervivència de *P. syringae* pv. *syringae* en solucions de fosetil-Al i fosfonat potàssic a diferents concentracions

Producte	Font de variació	Graus de llibertat	Suma de quadrats	F	P>F
Fosetil-Al	Soca	1	0.14	2.54	0.1174
	Temps d'exposició	1	0.05	0.85	0.3610
	Concentració de producte	1	0.05	0.87	0.3550
	Soca x temps	1	0.01	0.16	0.6898
	Soca x concentració	1	0.31	5.67	0.0210
	Temps x concentració	1	0.09	1.59	0.2128
	Error	53	2.75		
Fosfonat potàssic	Soca	1	0.01	0.61	0.4372
	Temps d'exposició	1	0.01	0.64	0.4260
	Concentració de producte	1	0.01	0.07	0.7959
	Soca x temps	1	0.04	1.75	0.1915
	Soca x concentració	1	0.01	0.01	0.9868
	Temps x concentració	1	0.03	1.33	0.2541
	Error	53	1.22		

Anàlisi de la covariància realitzada amb la mitjana dels valors de bacteris viables ( $\text{Log}_{10}$ ) de tres repeticions per tractament  
 Es va avaluar la supervivència de les soques EPS17a i EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* als 30 o 60 minuts d'exposició a solucions aquoses de fosetil-Al i fosfonat potàssic a les concentracions: 0, 0.16, 0.31, 0.62 i 1.24 g  $\text{HPO}_4^{2-}$  l<sup>-1</sup>

La supervivència de les dues soques va ser similar en cada un dels fosfonats, no havent-hi diferències significatives entre soques per cap dels productes (Taula 2.53). En les solucions de fosfonat potàssic es van observar una major estabilitat en el nombre de bacteris viables a les diferents concentracions i temps d'exposició, mentre que pel fosetil-Al es va observar una lleugera disminució en el nombre de bacteris viables en augmentar la concentració de producte (Figura 2.31). Per cap dels productes es van observar diferències significatives en el nombre de bacteris viables en funció del temps d'exposició.

El pH de les solucions aquoses de fosetil-Al i fosfonat potàssic va ser diferent en funció del producte i la concentració (Figura 2.32). Es va mesurar el pH d'un rang més ampli de concentracions i productes que els utilitzats en l'experiment. Les solucions amb etefon i fosetil-Al van presentar caràcter àcid (pH de 2 a 3.5 per l'etefon i de 4.5 a 3.5 pel fosetil-Al) disminuït el pH en augmentar la dosi de producte en els dos casos. La solució de fosfonat potàssic va mantenir un pH de 6 a les diferents concentracions, mentre que la solució de fosfomicina va presentar valors de pH de 7 a 9, augmentant el pH en augmentar la concentració.



**Figura 2.32.** pH del medi CYE i de les solucions aquoses amb fosfonats a diferents concentracions. Cada valor correspon a la mitjana de 6 repeticions. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana ( $P=0.05$ ).

Es va realitzar una anàlisi de la covariància per determinar l'efecte del pH de les solucions de fosfonats en la supervivència de *P. syringae* pv. *syringae*. Les variàncies del nombre de bacteris viables dels diferents tractaments es van mostrar homogènies segons la prova de Bartlett ( $(P>F)>0.05$ ), per cada producte. Els residus es van distribuir normalment segons la prova de Shapiro-Wilk, tant pel fosetil-Al ( $W=0.96$ ,  $(P<W)=0.229$ ) com pel fosfonat potàssic ( $W=0.97$ ,  $(P<W)=0.291$ ).

No es va observar efecte significatiu del pH de les solucions de fosetil-Al i fosfonat potàssic en la supervivència de les dues soques de *P. syringae* pv. *syringae* als 30 i 60 minuts d'exposició, segons l'anàlisi de la covariància (Taula 2.54).

**Taula 2.54.** Efecte del pH de les solucions de fosfonats en la supervivència de les soques EPS17a i EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* en funció del temps d'exposició a les solucions

<i>Producte</i>	<i>Font de variació</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>F</i>	<i>P&gt;F</i>
<i>Fosetil-Al</i>	pH	1	0.001	0.001	0.9818
	Temps d'exposició	1	0.005	0.123	0.7272
	Soca	1	0.063	1.408	0.2427
	Soca x pH	1	0.064	1.429	0.2394
	Soca x temps	1	0.008	0.173	0.6798
	Temps x pH	1	0.005	0.018	0.8950
	Error	53	2.119		
<i>Fosfonat potàssic</i>	pH	1	0.008	0.39	0.5337
	Temps d'exposició	1	0.002	0.09	0.7667
	Soca	1	0.004	0.19	0.6651
	Soca x pH	1	0.001	0.04	0.8425
	Soca x temps	1	0.011	0.54	0.8425
	Temps x pH	1	0.001	0.01	0.9507
	Error	53	1.362		

Anàlisi de la covariància realitzada amb la mitjana dels valors de bacteris viables ( $\text{Log}_{10}$ ) de tres repeticions per tractament  
 Es va avaluar la supervivència de les soques EPS17a i EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* als 30 i 60 minuts d'exposició a solucions aquoses de fosetil-Al i fosfonat potàssic a les concentracions: 0, 0.16, 0.31, 0.62 i 1.24 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  l<sup>-1</sup>. Els valors de pH de cada solució es mostren a la Figura 2.32. Només es van utilitzar els valors de pH corresponents als productes i concentracions de l'experiment

## DISCUSSIÓ

L'aplicació de fosfonats en plantes de perera per via radicular a la dosi d'1.86 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  l<sup>-1</sup> redueix la virulència de *P. syringae* pv. *syringae* en les fulles, respecte les plantes no tractades. L'efecte dels fosfonats varia en funció de l'edat de la fulla i la dosi d'inòcul. Com s'ha vist en el capítol anterior l'edat de la fulla i la dosi d'inòcul afecten la severitat de la malaltia en inocular *P. syringae* pv. *syringae* en perera. Aquests factors han afectat també l'activitat dels diferents fosfonats en la virulència del patogen. El major efecte dels fosfonats en la reducció de la virulència de *P. syringae* pv. *syringae* en perera s'ha obtingut en les fulles joves (més susceptibles), en les que la  $DE_{50}$  de patogen ha estat 10 vegades superior a la  $DE_{50}$  de les plantes no tractades. Podem dir, per tant, que els fosfonats avaluats tenen capacitat per reduir la virulència de *P. syringae* pv. *syringae* en perera en les condicions més òptimes pel desenvolupament de la malaltia (varietat i òrgan en estat susceptible, patogen virulent i dosi d'inòcul elevada).

Els diferents fosfonats han mostrat un efecte similar en la virulència del patogen. Aquest fet es pot explicar per la presència en tots ells d'un compost comú, l'àcid fosfònic (o ió fosfonat). El fosetil-Al i el fosfonat potàssic són hidrolitzats ràpidament en el sòl o en l'interior de la planta en àcid fosfònic ( $\text{H}_3\text{PO}_3$ ) (Cohen i Coffey, 1986). L'etefon és un agent alliberador d'etilè que en l'interior de la planta es descompon en etilè, ió clor (o àcid hidrocloàric) i fosfònic (Lawton i col., 1994). Dins la planta, l'àcid fosfònic és ionitzat a ió fosfonat ( $\text{HPO}_3^{2-}$ ) (Ouimette i Coffey, 1990). La descomposició de la fosfomicina en l'interior de la planta no es coneix. Diversos autors han observat que l'àcid fosfònic té activitat antifúngica directa, en concret, l'àcid fosfònic s'ha mostrat actiu en la inhibició del creixement del miceli i l' esporulació de diferents espècies de *Phytophthora* (Coffey i Joseph, 1985; Dolan i Coffey, 1988), en la disminució de la virulència del fong (Dunstan i col., 1990) i en la reducció de la severitat de les infeccions en la planta (Fenn i Coffey, 1984; Fenn i Coffey, 1985; Dolan i Coffey, 1988; Ouimette i Coffey, 1989). En base a això es pot considerar que la disminució de la virulència de *P. syringae* pv. *syringae* en perera i la reducció de la severitat de la malaltia podria ser deguda a l'activitat del fosfonat (possible metabolit comú de tots els productes avaluats) en l'interior de la planta, actuant directament sobre el bacteri i/o indirectament estimulant mecanismes de defensa en la planta.



S'ha observat un efecte diferencial en la multiplicació de *P. syringae* pv. *syringae* en perera en funció del fosfonat. El tractament de les plantes amb fosfomicina o etefon provoca la disminució de la població bacteriana inoculada en les fulles en 24 hores. En les plantes tractades amb fasetil-Al la població bacteriana es manté estable en les 48 hores posteriors a la inoculació i en les tractades amb fosfonat potàssic es produeix una multiplicació bacteriana similar a la de les plantes no tractades. El fet que en plantes tractades amb fasetil-Al o fosfonat potàssic s'observi una reducció de la severitat de la malaltia respecte les plantes no tractades als cinc dies de la inoculació amb *P. syringae* pv. *syringae*, fa pensar que per observar l'efecte d'aquests productes en la multiplicació bacteriana és necessari un període d'incubació més llarg, d'entre 3 i 5 dies, corresponent al temps necessari per a l'aparició de símptomes macroscòpics. Es pot dir, per tant, que la velocitat d'actuació dels fosfonats enfront de *P. syringae* pv. *syringae* en perera depèn del producte i pot estar relacionat amb la seva metabolització i transport en la planta. La fosfomicina s'ha mostrat com el producte més eficient i ràpid, probablement per l'activitat antibacteriana directa (Hendlin i col., 1969; Reeves, 1994). El ràpid efecte de l'etefon pot ser degut a l'acció combinada de l'àcid fosfònic amb la de l'etilè, compost que s'ha relacionat amb mecanismes de defensa de la planta o en la inducció de la resistència adquirida enfront de determinats patògens (Belles i col., 1991; Lawton i col., 1994; van Kan i col., 1995). En concordança amb els nostres resultats el fasetil-Al tampoc és actiu en la inhibició de la multiplicació de diferents patògens de *Xanthomonas campestris* en diferents espècies vegetals (Chase, 1993).

Els símptomes macroscòpics desenvolupats en fulles de plantes de perera inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* han estat diferents en funció del tractament o no amb fosfonats. Els símptomes observats en les fulles de les plantes tractades amb fasetil-Al, fosfonat potàssic, etefon o fosfomicina i inoculades amb *P. syringae* pv. *syringae* EPS94 han estat similars als de la situació incompatible en inocular *P. syringae* pv. *phaseolicola* (descrita en el capítol anterior). En les plantes tractades amb fosfonats s'han observat necrosis seques, limitades al punt d'inoculació o ocupant una superfície circumscripita al voltant del punt d'inoculació i bloquejades per un halo cloròtic. Els símptomes observats en les fulles de les plantes tractades amb els fosfonats són els característics de la resposta hipersensible (Goodman i Novacky, 1994). En les fulles de plantes no tractades en canvi, els símptomes desenvolupats han estat necrosis hidratades i expansives des del punt d'inoculació del patogen, corresponents a la infecció.

Els símptomes macroscòpics observats coincideixen amb les alteracions dels teixits a nivell microscòpic i ultraestructural. Al microscopi òptic i als microscopis

electrònics de rastreig i de transmissió s'observa un efecte dels fosfonats en la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera a les 48 hores de les inoculacions. Els canvis produïts en l'hoste i l'efecte sobre el bacteri són diferents en funció del tipus de fosfonat. En cap dels tractaments amb fosfonats s'han observat les estructures granulars en l'espai intercel·lular en contacte amb la paret cel·lular vegetal i amb el bacteri, observades en la situació compatible en les plantes no tractades amb fosfonats. En general, el tractament de les plantes amb fosfonats ha provocat alteracions en les cèl·lules parenquimàtiques dels teixits de la fulla, similars als observats en la situació incompatible i característics del desenvolupament de la resposta hipersensible: formació d'agregats fibril·lars extracel·lulars, pèrdua de la turgència cel·lular, discontinuïtat del plasmalemma, deposició de vesícules membranoses en la cara interna de la paret cel·lular en zones properes als bacteris, i lisi cel·lular de l'hoste amb abocament del material cel·lular a l'espai intercel·lular envoltant els bacteris. Tot això provoca una discontinuïtat de les cèl·lules parenquimàtiques i la desorganització del mesofil·le de la fulla. En les plantes tractades amb etefon o fosfomicina la desestructuració dels teixits i desorganització cel·lular han estat més intensos que en les tractades amb fosfetil-Al o fosfonat potàssic.

La fosfomicina i l'etefon són els productes que han mostrat major efecte en l'alteració de les cèl·lules i teixits de la planta durant la interacció amb el bacteri, coincidint amb els resultats obtinguts en l'efecte en la virulència i multiplicació de *P. syringae* pv. *syringae* i en el desenvolupament de símptomes macroscòpics.

En les fulles de plantes tractades amb etefon i infiltrades amb *P. syringae* pv. *syringae* es produeix el bloqueig de les cèl·lules bacterianes entre les cèl·lules vegetals, amb engruïment de la paret cel·lular vegetal i l'abocament del contingut de les cèl·lules parenquimàtiques a l'espai intercel·lular envoltant el bacteri. Això provoca probablement la mort de les cèl·lules vegetals en contacte amb el patogen i impedeix la infecció. Diversos treballs relacionen l'etefon o l'etilè (producte alliberat per l'etefon en la seva descomposició dins la planta) amb la resposta hipersensible. En diverses interaccions hoste-patogen s'ha observat un augment en la producció d'etilè per part de la planta, tant en la situació compatible (desenvolupament de la infecció) com en la incompatible (reacció hipersensible) (Bellés i col., 1991; van Kan i col., 1995). Es considera però, que la síntesi d'etilè per part de la planta és una resposta no específica (Bellés i col., 1991). En *Arabidopsis thaliana* tot i que sembla ser que l'etilè no indueix la resistència sistèmica adquirida (SAR) sí que actua sensibilitzant les cèl·lules a la resposta SAR (Lawton i col., 1994). Tot i això l'etefon i l'etilè no tenen per què actuar en les mateixes respostes de la planta. S'ha observat que mutants de tomatera productors en excés d'etilè no produeixen

proteïnes induïdes durant la patogènia, però sí les produeixen quan són tractades amb etefon. En mutants d'*Arabidopsis thaliana* insensibles a l'etilè, la inducció de gens de resistència per tractament amb etefon està relacionada amb els àcids alliberats en la descomposició d'aquest compost químic en la planta: àcid hidrocloàric i fosfònic (Lawton i col., 1994).

La fosfomicina ha mostrat, en aquest treball, un efecte directe sobre els bacteris, en observar-se cèl·lules bacterianes que han perdut l'estructura de la paret cel·lular. Això pot ser degut a l'activitat d'interferència del producte a nivell de síntesi de la paret cel·lular bacteriana (Hendlin i col., 1969). Addicionalment en les cèl·lules vegetals s'han observat també canvis característics de la resposta hipersensible.

El tractament de les plantes de perera amb fosetil-Al i fosfonat potàssic també ha provocat canvis en les cèl·lules vegetals de la zona infiltrada amb *P. syringae* pv. *syringae* característics de la resposta hipersensible. Diversos estudis indiquen que l'aplicació del fosetil-Al en plantes estimula el desenvolupament de símptomes característics de la resposta hipersensible com necrosis bloquejades que eviten el progrés de la infecció (Bompeix i col., 1980, 1981), col·lapse citoplasmàtic i mort cel·lular (Guest, 1984). S'ha observat que el fosetil-Al redueix el nivell de peroxidases secretades al medi extracel·lular en cultiu de cèl·lules de vinya (*Vitis vinifera*) actuant a nivell dels canals de  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  de la membrana cel·lular, interferint en el potencial de membrana (López-Serrano, 1997). En cítrics, el fosetil-Al i l'àcid fosfònic provoquen un augment en la producció de fitoalexines de forma similar a l'estimulació de la resposta hipersensible, limitant la infecció per *Phytophthora citrophthora* (Afek i Sztejnberg, 1989). El tractament de plantes de tabac amb fosetil-Al provoca el desenvolupament de la resposta hipersensible en front de *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*, amb una ràpida acumulació de fitoalexines, lignina i etilè, i un ràpid augment dels nivells de fenilalanina amoni liasa (Nemestothy i Guest, 1990).

El tractament de plantes de perera i tabac amb fosetil-Al ha provocat un augment en la permeabilitat cel·lular de discs foliars infiltrats amb bacteris fitopatògens virulents, respecte discs no infiltrats amb bacteris. En cada hoste estudiat, el fosetil-Al ha modificat la pauta de sortida d'electròlits dels discs infiltrats amb soques virulentes de *P. syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *tabaci*, respectivament (situació compatible), respecte les plantes no tractades. En perera, com ja s'ha comentat en el capítol anterior, en la situació compatible es produeix una ràpida i forta permeabilització cel·lular, mentre que en la situació incompatible la sortida d'electròlits dels discs foliars és lenta i progressiva. En

tabac, com en altres espècies vegetals (Brisset i col., 1994) la resposta és la inversa. En la situació compatible es produeix una permeabilització cel·lular lenta i progressiva i en la situació incompatible aquesta permeabilització és ràpida i forta. S'ha observat que el tractament de les plantes amb foseül-Al provoca canvis en la pauta de sortida d'electròlits en la situació compatible. En perera es produeix una permeabilització cel·lular lenta i progressiva i en tabac forta i ràpida, característiques en tots dos hostes de la interacció incompatible. Els valors de conductivitat final, la cinètica de sortida d'electròlits ( $K_0$  i  $b$ ) i el temps de pèrdua mitjana d'electròlits dels discs de fulles de plantes tractades amb foseül-Al són diferents als de plantes no tractades i similars als de la situació incompatible. En la situació incompatible el foseül-Al accentua la resposta en la planta. És a dir, en perera la sortida d'electròlits és més lenta que en les plantes no tractades i en tabac és més ràpida.

En el capítol anterior s'ha observat que la cinètica de sortida d'electròlits dels discs foliars depèn del tipus d'interacció hoste-patogen, podent definir en cada situació la pauta de sortida d'electròlits. Els canvis en la permeabilitat cel·lular dels teixits de la planta en la situació incompatible s'han relacionat amb el desenvolupament de la resposta hipersensible (Apostol i col., 1989; Atkinson i col., 1990). En base als resultats obtinguts en aquest treball sembla raonable pensar que el foseül-Al en perera i tabac intervé en la interacció hoste-patogen provocant, en la situació compatible (tabac/*P. syringae* pv. *tabaci* i perera/*P. syringae* pv. *syringae*), canvis en la permeabilitat cel·lular característics de la resposta hipersensible i, per tant del desenvolupament de mecanismes de defensa en la planta.

L'activitat del foseül-Al en la permeabilitat cel·lular dels teixits de perera inoculats amb *P. syringae* pv. *syringae* s'observa a les 24-48 hores de la inoculació. Durant aquest període de temps no s'observa efecte del foseül-Al en la supervivència del bacteri infiltrat, però sí en els canvis estructurals en els teixits de les fulles de la planta. Això fa pensar que el desenvolupament d'una resposta hipersensible en les plantes tractades amb foseül-Al sigui degut a l'activitat del fosfonat dins la planta estimulants la resistència al patogen, més que a l'actuació directa sobre el bacteri. Tot i això, el fosfonat podria actuar reduint la virulència del patogen sense afectar la seva viabilitat o creixement. Dunstan i col. (1990) van observar que el fosfonat provoca una reducció en la producció de polisacàrids i lipoproteïnes en la superfície de *Phytophthora infestans*, sense que el creixement del fong quedi afectat. Aquestes proteïnes tenen la capacitat de suprimir la resposta de defensa de la planta. Segons això el fosfonat pot actuar en els mecanismes de reconeixement hoste-patogen i a través d'aquests en el sistema de defensa de l'hoste. S'han proposat dos

possibles mecanismes d'actuació, en primer lloc, els fosfonats incrementarien o activarien la producció d'inductors produïts pel patogen, i en segon lloc, els fosfonats inhibirien la producció o activitat dels supressors per part de la planta (Guest i Grant, 1991).

Seria interessant estudiar l'efecte del fosfonat potàssic, l'etefon i la fosfomicina en la permeabilitat cel·lular dels teixits de perera en la interacció amb *P. syringae* pv. *syringae*, per poder comparar l'efecte dels diferents productes i relacionar-ho amb la seva activitat en altres aspectes de la interacció hoste-patogen.

En mongetera, s'ha observat una diferència clara en la pauta de sortida d'electròlits entre la situació compatible/incompatible en funció del bacteri infiltrat, produint-se un augment fort i ràpid de la permeabilitat cel·lular en la situació incompatible i lent i progressiu en la compatible. Aquests resultats són similars als obtinguts per Brisset i col. (1994). El tractament de les plantes amb etefon ha provocat una ràpida i forta sortida d'electròlits dels discs foliars de mongetera infiltrats amb el patogen, similar a l'observada en la situació incompatible. No s'ha observat, en canvi, un efecte clar en la permeabilitat cel·lular del tractament de les plantes amb fosetil-Al o fosfomicina. Tampoc s'ha observat una clara diferència en la cinètica de sortida d'electròlits en funció de la sensibilitat varietal. Les varietats Michelet (sensible) i Vaillant (resistent) han mostrat diferent pauta de sortida d'electròlits, en canvi entre les varietats Coco (sensible) i Dorabel (resistent) no s'han observat diferències significatives. La metodologia utilitzada per estudiar els canvis de la permeabilitat cel·lular en mongetera en la interacció amb *P. syringae* pv. *phaseolicola* no ha permès diferenciar de forma clara totes les situacions. És possible que per això no s'hagin observat efectes clars i diferencials dels fosfonats. Varis factors com el material vegetal, la dosi d'inòcul i les condicions d'incubació, poden afectar la sortida d'electròlits de cèl·lules de la planta inoculades amb bacteris (Brisset, 1990). És important definir les condicions experimentals (edat i tipus de material vegetal, concentració bacteriana, medi i condicions d'incubació) que permetin observar de forma clara els canvis produïts en cada situació. És possible que les condicions que permeten estudiar la sortida d'electròlits en perera, definides per Brisset (1990), no siguin les més idònies per mongetera. Caldrà doncs definir les condicions experimentals que permetin caracteritzar les diferents situacions que tenen lloc en la interacció hoste-patogen en mongetera, per poder avaluar l'efecte dels fosfonats en la interacció.

El tractament de plantes de perera amb fosfonats provoca una reducció significativa i consistent de la malaltia en inocular *P. syringae* pv. *syringae*. Per totes les formes d'aplicació (via radicular, absorció per la tija o per polvorització foliar) i material

vegetal utilitzats (branques, plantes en hivernacle i arbres a camp) s'ha observat efecte dels fosfonats en la reducció de les infeccions i del desenvolupament de la malaltia. Tanmateix, l'eficiència dels fosfonats en la reducció de la malaltia està relacionada amb la forma d'aplicació, la dosi i cadència, i el tipus de producte aplicat. També s'ha observat efecte de l'estat fenològic de l'hoste.

La forma d'aplicació del fosetil-Al en perera afecta el control de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae*. La  $DE_{50}$  de fosetil-Al aplicat en medi hidropònic en branques de perera és de 0.56 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$ , mentre que regant les plantes és d'1.27 a 3.95 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  (segons l'experiment). L'aplicació en medi hidropònic permet l'entrada ràpida i directa del fosfonat als teixits conductors de les branques (xilema o floema), i d'aquí el transport a les fulles, mentre que la incorporació al substrat implica l'absorció per les arrels i l'entrada i transport pels teixits conductors de la planta fins les fulles. L'aport de sacarosa en les solucions de fosetil-Al pot haver incrementat l'entrada de fosfonat en les branques, ja que la sacarosa incrementa l'entrada de fosfonat al floema (Ouimette i Coffey, 1990). En les branques, el fosetil-Al és possible que hagi estat absorbit sense ser metabolitzat en fosfònic, ja que la degradació no enzimàtica dels fosfonats depèn del pH i la temperatura, i a temperatura ambient és molt lenta. En el sòl en canvi, la degradació del fosetil-Al, en la que hi intervenen microorganismes, és molt ràpida, amb una vida mitjana de 0.3 a 2 dies (Cohen i Coffey, 1986). Tot i que la planta pot absorbir el fosetil i metabolitzar-lo, la major part del producte aplicat al sòl és absorbit en forma de fosfònic (Cohen i Coffey, 1986). Una vegada dins la planta el fosfonat és acumulat en els teixits metabòlicament actius, ja que la planta no el metabolitza (Guest i Grant, 1991). En alvocat (*Persea indica*) l'aplicació de fosetil-Al sobre incisions realitzades en el tronc produeix un major control de la infecció de *Phytophthora citricola*, amb nivells de fosfonat detectats en la zona infectada superiors, que regar les plantes. Aquest fet és atribuït a l'entrada del fosetil directament al floema (El-Hamalawi i col., 1995). La determinació de la concentració de fosfonat en les fulles de les branques i de les plantes de perera tractades amb fosetil-Al podria explicar la diferència en el control de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en funció de la forma d'aplicació del producte.

El fosetil-Al i el fosfonat potàssic han mostrat un comportament similar en la reducció de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en fulles separades de la planta. Les  $DE_{50}$  han estat similars (1.27 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  i 1.29 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  respectivament) i els nivells de reducció de la severitat de la infecció (40-50 %) equivalents, en ser aplicats per via radicular a la dosi d'1.86 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$ . En canvi, en les inoculacions en la planta sencera, el fosfonat potàssic ha mostrat una major reducció de la severitat de la malaltia que el

fosetil-Al. Els valors de  $DE_{50}$  pel fosfonat potàssic han estat inferiors als del fosetil-Al (2.92 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  i 5.42 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  respectivament). L'efecte similar del fosetil-Al i el fosfonat potàssic en el control de malalties causades per *Phytophthora* en diferents espècies vegetals (Fenn i Coffey, 1984; Cohen i Coffey, 1986), ha estat explicat per l'acció de l'àcid fosfònic. Tot i això sovint s'observa major eficàcia del fosfonat, amb  $DE_{50}$  inferiors degut a que el fosetil-Al ha de ser metabolitzat a  $H_3PO_3$  (Dolan i Coffey, 1988).

L'aplicació de fosfonats en plantes de perera per via radicular a la dosi d'1.86 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  redueix la severitat de la malaltia en un 40-75% en les fulles separades de la planta, i en un 10-75% en la planta sencera. El nivell de reducció és diferent en funció del fosfonat. Els productes més eficients han estat l'etefon i la fosfomicina, mentre que el fosfonat potàssic i el fosetil-Al han mostrat una eficàcia mitjana, no reduint la malaltia en més d'un 50% respecte el control. L'efecte de cada fosfonat en la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* coincideix amb l'efecte que han mostrat en la virulència i multiplicació de *P. syringae* pv. *syringae* en la planta i amb la simptomatologia i canvis estructurals desenvolupats en els teixits de perera. No s'ha observat relació entre l'activitat dels diferents fosfonats en el control de *P. syringae* pv. *syringae* en perera i el pH de les solucions aquoses dels fosfonats, (pH de 2 a 8, segons el fosfonat) o del substrat regat amb els fosfonats (pH de 5.3 a 6.2).

Els nivells de control de la infecció per *P. syringae* pv. *syringae* en perera amb fosetil-Al o fosfonat potàssic són similars als obtinguts en el control d'altres malalties bacterianes. El fosetil-Al té un baix efecte, amb resultats inconsistents, en el control d'*E. amylovora* en plantes de perera en hivernacle, tot i que en les aplicacions a camp s'obté un efecte clar i significatiu del producte en el control del foc bacterià (Paulin i col., 1990). L'eficàcia del fosetil-Al aplicat a la dosi de 3 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  en el control de *Xanthomonas campestris* en plantes ornamentals és variable i inconsistent amb valors mitjans del 58% (Chase, 1993). Aquests resultats contrasten amb l'eficàcia del fosetil-Al i fosfonat potàssic en el control de certes malalties fúngiques. La infecció de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* en tabac és controlada totalment amb aplicacions de 0.93 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  de fosetil-Al o de 0.70 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  de fosfonat potàssic (Fenn i Coffey, 1989).

El control de malalties bacterianes en espècies ornamentals amb fosetil-Al és afectat per la dosi, cadència i nombre d'aplicacions (Chase, 1993). En el control d'*E. amylovora* en perera també s'observa un clar efecte de la dosi de fosetil-Al, millorant en el control en augmentar la dosi o el nombre d'aplicacions (Paulin i col., 1990). D'acord amb

aquests resultats, el control de la infecció per *P. syringae* pv. *syringae* en plantes de perera, s'incrementa en augmentar la dosi dels diferents fosfonats avaluats o la freqüència de les aplicacions. La fosfomicina és el producte que presenta major efecte en la reducció de la malaltia, amb una  $DE_{50}$  inferior a  $0.5 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ . L'etefon també provoca una reducció important de la malaltia, amb una  $DE_{50}$  d' $1.47 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ . Dosis superiors d'etefon provoquen problemes de fitotoxicitat i de creixement en les plantes. El foseetil-Al i el fosfonat potàssic, en canvi s'han mostrat mitjanament efectius, amb  $DE_{50}$  superiors. La reducció màxima de la malaltia en planta amb tractaments de foseetil-Al i fosfonat potàssic s'obté a dosis superiors a la dosi agronòmica recomanada pel control de malalties bacterianes o fúngiques ( $1.86 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$ , equivalent a  $3 \text{ g i.a. l}^{-1}$ ) i amb una elevada freqüència d'aplicacions (5-6 dies). Les  $DE_{50}$  de foseetil-Al i de fosfonat potàssic pel control de *P. syringae* pv. *syringae* en perera són també superiors a les obtingudes en el control de malalties fúngiques. Per exemple, en el control de *Phytophthora* spp. en alvocat la  $DE_{50}$  de foseetil-Al és de  $16.1 \text{ mg HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  i en tomatera de  $220.7 \text{ mg HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  (Fenn i Coffey, 1984; Dolan i Coffey, 1988).

En plantacions a camp, el tractament d'arbres de perera de diferents varietats amb foseetil-Al a la dosi d'  $1.86 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  ha tingut un efecte significatiu en el control de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en 7 de les 12 varietats avaluades. Cal destacar, però que l'eficiència ha estat molt baixa. Tot i que per totes les varietats s'observa una reducció de la severitat de la malaltia en els arbres tractats amb foseetil-Al, l'efecte és diferent en funció de la varietat. El diferent comportament de les varietats no es pot relacionar amb la sensibilitat al patògen, ja que l'aplicació de foseetil-Al ha reduït significativament la infecció del patògen tant en fulles de varietats sensibles (Alexandrine, B. Anjou, General Leclerc i Passe Crassane) com mitjanament o poc sensibles (Blanquilla, Maxine i Winter Nellis), mentre que en altres varietats sensibles com Conference i Comice no s'ha observat efecte significatiu del tractament. Aquesta diferència en el control de la malaltia per part del foseetil-Al es podria atribuir a la metabolització i transport del fosfonat en la planta lligat a l'estat fenològic dels arbres de les diferents varietats en el moment de realitzar els tractaments.

L'activitat del foseetil-Al, el fosfonat potàssic, l'etefon i la fosfomicina, aplicats per via radicular, en el control de la malaltia en les fulles implica l'absorció dels productes o dels seus metabolits per les arrels i el transport per l'interior de la planta fins les fulles. Hi ha per tant, una mobilitat dels diferents productes en l'interior de la planta. El fosfonat, metabolit actiu del foseetil-Al, fosfonat potàssic i etefon, és transportat en la planta i translocat tant pel xilema com floema, implicant en el cas del transport pel floema, una



entrada de forma activa a través del simplast. Una vegada dins el floema, el fosfonat és transportat per flux en massa cap els òrgans metabòlicament actius (Ouimette i Coffey, 1990). La fosfomicina, o algun metabolit actiu resultant de la seva descomposició en el sòl o en la planta, també hauria presentat mobilitat en perera. Aquesta mobilitat dels fosfonats ha estat posada de manifest en plantes d'alvocat regades amb fosetil-Al a la dosi d' $1.5 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  en que es van detectar nivells de fosfonat en les fulles de l'ordre de  $0.32 \text{ g HPO}_3^{2-} \text{ kg}^{-1}$  pes fresc, amb nivells màxims de fosfonat en els teixits de la planta a les 3-6 setmanes del tractament (El-Hamalawi i col., 1995). La detecció i quantificació dels nivells de fosfonat ( $\text{HPO}_3^{2-}$ ) en l'interior de les plantes de perera tractades amb els diferents productes permetria conèixer i comparar la metabolització i mobilitat de cada un d'ells en l'interior de la planta i ajudaria a comprendre la seva forma d'actuació.

Els nivells de fosfonat en els teixits de la planta han estat relacionats amb el control de malalties causades per oomicets. Els nivells de fosfonat i el control de la malaltia es veuen afectats per la forma d'aplicació del producte, la concentració, formulació i el temps després de l'aplicació. L'aplicació de fosetil-Al sobre incisions realitzades en el tronc de plantes d'alvocat protegeix de la infecció per *Phytophthora* spp. durant 5-6 mesos (El-Hamalawi i col., 1995), i l'aplicació dues vegades a l'any (juny i octubre) de fosetil-Al en plantacions de pomera permeten el control total de la infecció per *Phytophthora cactorum* (Utkhede i Smith, 1995). En perera l'aplicació de fosetil-Al a la primavera protegeix les plantacions disminuint la incidència de la necrosi de borrons de flor a la primavera següent (Montesinos i Vilardell, 1991a, 1996)

A diferència dels resultats consistents obtinguts en el present treball, diversos autors han obtingut resultats inconsistents en el control de malalties bacterianes amb fosetil-Al (Paulin i col., 1990; Chase, 1993). En haver-hi una metabolització i transport dels fosfonats en l'interior de la planta l'efecte i eficàcia d'aquests productes en el control de la malaltia es poden veure afectats per l'estat fenològic i activitat de la planta i per les condicions ambientals. Això pot explicar les diferències entre repeticions d'un mateix experiment i la variabilitat en l'eficàcia d'aquests productes. També explicaria el major control de la malaltia observat en les fulles del brot tendre de les plantes respecte les fulles del brot de més d'un any en alguns dels experiments realitzats amb planta sencera en aquest treball.

Tot i que la fosfomicina i l'etefon han estat els productes més eficients en el control de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera, aquests productes presenten limitacions en la seva utilització pel control de la malaltia. L'etefon pot tenir efectes

secundaris en les plantes com a resultat de l'alliberació i actuació de l'etilè en els teixits vegetals. De fet, a dosis properes a la  $DE_{50}$  s'han observat problemes de fitotoxicitat i creixement en les plantes. Per altra banda, la fosfomicina és un antibiòtic d'ús restringit pel control de determinades malalties bacterianes en humans i animals.

Tant el fosetil-Al com el fosfonat potàssic són efectius en el control de *P. syringae* pv. *syringae* en perera, encara que amb una reducció moderada dels nivells de malaltia. El nombre d'aplicacions i la dosi de fosetil-Al o fosfonat potàssic necessaris pel control de la infecció són elevats i com s'ha vist, superiors als utilitzats en el control de malalties fúngiques. El transport del fosfonat pel floema, permet realitzar l'aplicació dels productes en el moment en que l'estat fenològic de l'hoste sigui l'adient per a que l'òrgan que calgui protegir estigui metabòlicament actiu. D'aquesta manera pot augmentar el nivell de fosfonats en l'òrgan infectat i obtenir major control de la malaltia. Caldrà, per tant, realitzar nous assajos amb l'objectiu de millorar l'eficàcia de penetració dels productes en la planta amb noves formes d'aplicació, que permetin una incorporació més ràpida o directa del fosfonat al floema de la planta. Serà interessant determinar el moment d'aplicació idoni per a que el contingut de fosfonat en l'òrgan a protegir sigui elevat en el moment de la infecció. Per això, caldrà realitzar assajos paral·lels en plantes en hivernacle i en arbres en plantació de manera que es puguin avaluar i comparar les diferents formes d'aplicació dels productes i relacionar la concentració de fosfonat en els teixits vegetals amb el control de la malaltia.

La moderada activitat dels fosfonats en el control de la malaltia desenvolupada per *P. syringae* pv. *syringae* en perera contrasta amb la baixa activitat que presenten *in vitro*, tret de la fosfomicina. El fosetil-Al, fosfonat potàssic i etefon mostren baixa o nul·la activitat en la inhibició del creixement de les espècies bacterianes avaluades. Per aquests bacteris les CMI's són elevades, de 0.32 a 0.63 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$ , properes a les dosis efectives mitjanes obtingudes en planta per algun d'ells, i a la dosi agronòmica de fosetil-Al recomanada pel control de malalties bacterianes, entre 1.37 i 2.7 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  (Chase, 1993).

La fosfomicina presenta una activitat antimicrobiana *in vitro* superior a la de la resta de fosfonats, amb CMI's d'entre 2.5 i 80 mg  $HPO_3^{2-} l^{-1}$ , però inferior a l'estreptomicina. La fosfomicina és un antibiòtic d'ampli espectre utilitzat en el control de malalties causades per bacteris aerobis Gram negatius i Gram positius, amb excepcions com *P. aeruginosa* (Reeves, 1994). L'activitat antibacteriana *in vitro* de la fosfomicina depèn de la composició del medi utilitzat. La presència de glucosa o fosfat disminueixen

l'activitat de la fosfomicina de forma significativa, probablement degut a la inhibició per part d'aquests compostos del sistema de transport de la fosfomicina a l'interior del bacteri per la via del L- $\alpha$ -glicerofosfat (Hendlin i col., 1969). El medi CYE és un medi que no conté glucosa (com a font de carboni porta glicerol) ni fosfat afegits, per tant la baixa activitat de la fosfomicina respecte l'estreptomicina no pot ser explicada per la composició del medi.

Els resultats d'activitat antibacteriana *in vitro* obtinguts pel fosetil-Al i fosfonat potàssic contrasten amb la forta inhibició del creixement de miceli i esporulació de *Phytophthora* spp. observada en medi amb baix contingut de fosfats amb addició de fosfonat a dosis de 0.069 a 0.552 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  (Fenn i Coffey, 1984, 1985), i amb les  $\text{DE}_{50}$  de fosetil-Al per la inhibició del creixement del fong, entre 0.2 i 1 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  (Farih i col., 1981). En aquest sentit, el nivell de fosfat present en el medi determina la sensibilitat al fosfonat d'algunes espècies de *Phytophthora*. Concentracions de 0.1 a 1 mM de fòsfor (Pi) són suficients per afectar significativament la taxa d'acumulació de fosfonat pel fong i la toxicitat d'aquest, reduint o anul·lant la seva activitat (Griffith i col., 1993). La inhibició de l'efecte del fosfonat pel fosfat és deguda a la competència pel sistema de transport del fosfat a l'interior del fong (Fenn i Coffey, 1984). El baix contingut en fosfat del medi CYE (0.029 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ ) fa descartar la possibilitat que la baixa activitat *in vitro* d'aquests productes sigui deguda a l'efecte del fosfat. Una altra possible explicació de la baixa activitat *in vitro* seria la metabolització dels fosfonats per part dels bacteris. De fet, diferents espècies bacterianes, entre elles algunes espècies del gènere *Pseudomonas*, tenen capacitat d'utilitzar organofosfonats (fosfonats amb un enllaç C-P) com a font de carboni o de fòsfor (Jacob i col., 1988; Zboinska i col., 1992). Wackett i col. (1987) van obtenir soques bacterianes (principalment bacils Gram negatius com *Pseudomonas* spp. i *Agrobacterium radiobacter*) capaces de trencar l'enllaç C-P de fosfonats com la fosfomicina, glifosat i àcids alquilfosfònics mitjançant un enzim carboni-fosfor liasa, i utilitzar-los com a font de carboni, nitrogen o fòsfor. També ha estat descrit que *Pseudomonas fluorescens* és capaç d'utilitzar el fosfonat com a font de fòsfor pel creixement, i acumular el seu producte d'oxidació (fosfat) (Cohen i Coffey, 1986; Zboinska i col., 1992).

La baixa activitat antibacteriana del fosetil-Al i el fosfonat potàssic en medi CYE coincideix amb l'elevada supervivència de *P. syringae* pv. *syringae* en solucions aquoses dels dos fosfonats a concentracions d'1.25 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  o inferiors. Aquests resultats contrasten amb la sensibilitat *in vitro* de *Xanthomonas* spp. i *Pseudomonas* spp. en solucions de fosetil-Al de 0.42 a 0.84 g  $\text{HPO}_3^{2-} \text{ l}^{-1}$  descrita en altres treballs (Chase,

1993). La inhibició del creixement bacterià *in vitro* pel fosetil-Al observada per Chase (1993) ha estat interpretada com una activitat directa lligada al pH. El pH de solucions aquoses de fosetil-Al té valors d'entre 3 i 4, i el pH mínim pel creixement de les diferents espècies bacterianes determinat per Chase (1993) és de 4.5 a 5.5. Segons els nostres resultats, el diferent pH de les solucions amb els dos fosfonats (de 3.5 a 4.5 pel fosetil-Al i de 5.5 a 6 pel fosfonat potàssic) no afecta la supervivència de *P. syringae* pv. *syringae*, ja que s'ha observat un comportament similar en les solucions dels dos productes.

Tot i que el fosetil-Al pot presentar baixa activitat antifúngica *in vitro* en front d'algunes espècies de *Pythium* i *Phytophthora* resistents, amb  $DE_{50}$  de 0.25 a 1 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  (Farih i col, 1981; Cohen i Coffey, 1986), en aquestes espècies l'àcid fosfònic té una elevada activitat inhibidòria del creixement, amb  $DE_{50}$  de 0.005 a 0.2 g  $HPO_3^{2-} l^{-1}$  (Fenn i Coffey, 1984). Això va portar a formular la hipòtesi que el fosfonat (o àcid fosfònic) té una acció antifúngica directa i que el fosetil-Al, en descomposar-se en fosfonat, *in vivo* actuaria de la mateixa forma (Cohen i Coffey, 1986). En el present treball el fosfonat potàssic i el fosetil-Al han presentat el mateix comportament *in vitro* en front de *P. syringae* pv. *syringae*, no observant-se una forma d'actuació directa sobre el bacteri. Per altra banda, l'activitat similar dels dos fosfonats en el control de *P. syringae* pv. *syringae* en la planta fa pensar en l'activitat d'un metabolit actiu comú dels dos productes (probablement fosfonat) que actui en la planta induint la resistència o estimulants mecanismes de defensa.

En base als resultats obtinguts, l'efecte del fosetil-Al i del fosfonat potàssic en el control de la infecció per *P. syringae* pv. *syringae* en perera sembla ser deguda a l'estimulació de mecanismes de defensa en la planta més que a l'acció directa sobre el bacteri. La baixa activitat antibacteriana d'aquests fosfonats, juntament amb l'eficàcia en el control de la malaltia fa pensar en la possibilitat de la utilització d'aquests productes en sistemes de control integrat de *P. syringae*. Es podrien combinar aplicacions de fosetil-Al o fosfonat potàssic amb mesures de control biològic. Per altra banda, la toxicitat d'aquests productes, i dels fosfonats (àcid fosfònic i esters de l'àcid fosfònic) en general és baixa. L'etefon, el fosetil-Al i la fosfomicina presenten una toxicitat baixa i similar. La  $DL_{50}$  per ingestió oral en rates per l'etefon i el fosetil-Al és de 4229 mg  $Kg^{-1}$  i 5800 mg  $Kg^{-1}$ , respectivament (Muccinelli, 1997) i per la fosfomicina de 4000 mg  $Kg^{-1}$  (Hendlin i col., 1969). No hi ha evidències que els mamífers o les plantes puguin oxidar el fosfonat a fosfat. Addicionalment, en el sòl, el fosfonat és oxidat a fosfat pels microorganismes residents i per tant no constitueix un residu recalcitrant (Guest i Grant, 1991).

Tot i que aquest treball ha permès aprofundir en aspectes desconeguts de l'activitat dels fosfonats en la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera i en el control de la malaltia, la forma d'actuació d'aquests productes no està del tot clara. Caldrà doncs, utilitzar les metodologies que s'han desenvolupat per estudiar l'efecte d'aquests productes en l'estimulació de mecanismes de defensa en la planta. Seria interessant estudiar l'efecte dels fosfonats en la síntesi de fitoalexines en la planta, alliberament i oxidació de fenols, activitat de peroxidases, polifenoloxidasas, proteïnes PR, i altres compostos que intervinguin en el desenvolupament de la resposta hipersensible en perera. La comparació amb la resposta de varietats poc sensibles o resistents de perera a *P. syringae* pv. *syringae* pot ajudar a conèixer el mecanisme d'acció d'aquests productes i millorar el control de la necrosi bacteriana de la perera.

## CONCLUSIONS

---

1) S'han determinat, en condicions controlades, els factors que afecten la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera. El desenvolupament de la malaltia i la severitat de les infeccions depenen de la temperatura d'incubació, l'estat fenològic de l'òrgan, la varietat de perera i la dosi d'inòcul i virulència del patogen. La temperatura òptima pel desenvolupament de la malaltia es situa entre 20 i 25 °C. Les fulles joves, formades sobre brots en creixement actiu, són més susceptibles que les dels brots que han aturat el creixement. La dosi crítica de *P. syringae* pv. *syringae* pel desenvolupament de la malaltia i observació dels símptomes és de  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>, i la DE<sub>50</sub> és de  $5 \times 10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>, encara que per observar símptomes clars de la malaltia, diferents dels de la resposta hipersensible, són necessàries dosis d'entre  $10^7$  i  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>.

2) Totes les soques de *P. syringae* pv. *syringae* avaluades s'han mostrat patogèniques en perera, amb diferent grau de virulència en funció de la soca. Tot i que no s'ha pogut relacionar la virulència de les soques amb el seu origen, les soques aïllades d'un hoste diferent a la perera o de teixits sans han estat menys virulentes que les aïllades de teixits infectats.

3) S'ha observat diferent sensibilitat a *P. syringae* pv. *syringae* entre les varietats de perera. La majoria de les varietats d'interès comercial (Abate Fétel, Alexandrine, Beurre Anjou, Blanquilla, Conference, Doyenne du Comice, General Leclerc, Passe Crassane, i Williams) són sensibles. Entre les poc sensibles s'hi troben varietats autòctones (MB-6, MB-7 i MB-14) i les varietats Maxine, Rogue Red i Winter Nellis.

4) Les tècniques d'inoculació en fruits immadurs de perera i d'inoculació en fulles joves separades de la planta han permès avaluar, sota condicions ambientals precises i controlades, la patogenicitat i virulència de soques de *P. syringae* pv. *syringae* en perera i la sensibilitat de diferents varietats al patogen, obtenint resultats similars amb les dues tècniques. Tot i això, amb la tècnica d'inoculació en fulles separades de la planta s'ha diferenciat de forma més clara la sensibilitat de les varietats. Aquesta tècnica presenta avantatges com permetre processar major nombre de mostres, controlar la dosi i quantitat

de patogen inoculat i utilitzar material vegetal de tamany reduït i disponible durant un període de temps més llarg que els fruits.

5) La tècnica d'inoculació per microinfiltració localitzada de *P. syringae* pv. *syringae* en les fulles en plantes de perera, permet inocular dosis conegudes de patogen i observar la resposta de la planta sencera durant la interacció. En la utilització d'aquesta tècnica és important tenir en compte la dosi d'inòcul, les característiques del material vegetal i les condicions d'incubació. La utilització de plantes de varietats sensibles, com Conference, amb brots en creixement actiu, de soques virulentes del patogen (EPS94) a dosis d'entre  $10^7$  i  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, juntament amb condicions d'incubació de 20-25 °C de temperatura i humitat relativa del 70-80%, permeten el desenvolupament de la malaltia i l'observació de símptomes clars als 3-5 dies. S'ha utilitzat aquesta tècnica per conèixer determinats aspectes de la interacció *P. syringae* - perera, caracteritzant en cada cas, les situacions compatible i incompatible.

6) L'evolució de la població de *P. syringae* i el desenvolupament de símptomes macroscòpics en fulles de plantes de perera depenen del tipus d'interacció i de la dosi inicial d'inòcul. En la interacció compatible (*P. syringae* pv. *syringae*) la població bacteriana inoculada en les fulles augmenta al llarg del temps, mentre que en la situació incompatible (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) es manté estable o disminueix. Els símptomes desenvolupats en cada situació són diferents: necrosis hidratades, progressant per la fulla en la situació compatible i necrosis bloquejades seques, limitades al punt d'inoculació en la incompatible.

7) L'observació al microscopi electrònic dels teixits foliars de perera infiltrats amb *P. syringae* ha permès posar de manifest la localització dels bacteris i la interacció amb les cèl·lules de l'hoste, en cada situació. Tant en la situació compatible com en la incompatible els bacteris es localitzen en l'espai intercel·lular de les cèl·lules parenquimàtiques del mesofil·le de la fulla, properes a les parets cel·lulars vegetals. En la situació compatible s'estableix contacte físic directe entre la cèl·lula bacteriana i la cèl·lula vegetal, a través de la paret cel·lular, o bé per estructures granulars electrodenses que apareixen en la superfície de la paret cel·lular vegetal en zones amb bacteris propers. L'origen i naturalesa d'aquestes estructures electrodenses, que només apareixen en la situació compatible, així com el paper que juguen en el desenvolupament de la patogènia de *P. syringae* pv. *syringae* en perera no s'ha determinat. En la situació incompatible els bacteris queden bloquejats en l'espai intercel·lular formant agregats envoltats per material fibril·lar del qual tampoc es coneix l'origen i composició.

8) La interacció *P. syringae*-perera provoca canvis en la permeabilitat de les cèl·lules vegetals, diferents en funció del tipus de situació compatible o incompatible. La utilització del model monomolecular amb taxa de sortida d'electròlits variable en el temps ha permès caracteritzar la pauta de sortida d'electròlits dels discs foliars infiltrats amb *P. syringae* en cada situació i comparar-les quantitativament mitjançant els paràmetres  $K_0$ ,  $b$  i  $t_{50}$ . En la interacció compatible es produeix una ràpida i forta permeabilització cel·lular, mentre que en la incompatible l'augment de permeabilitat cel·lular és lent i progressiu.

9) La utilització de les metodologies i models d'estudi desenvolupats (plantes de perera de la varietat Conference amb brots en creixement actiu, soca EPS94 de *P. syringae* pv. *syringae* virulenta i dosi d'inòcul de  $5 \times 10^7$  ufc ml<sup>-1</sup>) ha permès conèixer aspectes de l'activitat de diferents fosfonats en la interacció *P. syringae* pv. *syringae*-perera i en el control de la malaltia. Aquestes metodologies i models podrien ser utilitzats en l'estudi d'altres interaccions hoste-patogen i de l'activitat de productes químics en la interacció.

10) L'aplicació de fosfonats en plantes de perera provoca el desenvolupament de símptomes macroscòpics i microscòpics i canvis en la permeabilitat dels teixits foliars en infiltrar *P. syringae* pv. *syringae* similars als de la interacció incompatible. En les fulles de les plantes tractades amb fosfonats i inoculades amb el patogen s'observen necrosis seques, bloquejades, sovint limitades per un halo cloròtic. A nivell microscòpic i d'ultraestructura en les cèl·lules parenquimàtiques del mesofil·le de fulles infiltrades amb el patogen de plantes tractades amb fosfonats s'observen modificacions característiques de la situació incompatible (desorganització cel·lular i dels teixits, pèrdua de turgència de les cèl·lules vegetals i bloqueig de les cèl·lules bacterianes en l'espai intercel·lular quedant envoltades per una matriu fibril·lar). La pauta de sortida d'electròlits de teixits foliars de plantes tractades amb fosetil-Al infiltrats amb *P. syringae* pv. *syringae* es similar a la de la situació incompatible i diferent a la de la situació compatible, per cada un dels hostes utilitzats.

11) El tractament de plantes de perera amb fosfonats provoca una reducció significativa i consistent de la malaltia en inocular *P. syringae* pv. *syringae* i redueix la virulència del patogen. L'efecte dels fosfonats està relacionat amb la forma d'aplicació, la dosi i cadència i el tipus de producte aplicat, i depèn de l'estat fenològic de l'hoste. El fosetil-Al i el fosfonat potàssic es comporten de forma similar en el control de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae*, amb reduccions del 40-50% de la severitat de la malaltia, i  $DE_{50}$  de 5.5 i 2.9 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>, respectivament. L'etefon i la fosfomicina tenen major efecte en la reducció de la malaltia (del 60 al 80 %) amb  $DE_{50}$  d'1.47 i 0.50 g HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> l<sup>-1</sup>,



respectivament. Tot i que l'etefon i la fosfomicina són els productes més eficients en el control de la infecció de *P. syringae* pv. *syringae* en perera, la utilització d'aquests productes presenta limitacions. L'etefon pot tenir efectes secundaris en la planta, afectant el seu creixement, i la fosfomicina és un antibiòtic d'ús restringit en clínica. Caldrà doncs, millorar l'eficàcia del fosfonat potàssic i el fosetil-Al en el control de la malaltia determinant la forma i el moment d'aplicació idonis per afavorir l'absorció dels productes i la seva translocació en la planta fins l'òrgan a protegir.

**12)** El fosetil-Al, fosfonat potàssic i etefon presenten baixa activitat antibacteriana *in vitro*, amb CMI's elevades, de 0.32 a 0.63 g  $\text{HPO}_3^{2-}$  l<sup>-1</sup>. Els canvis observats en els teixits de plantes tractades amb fosfonats i inoculats amb el patogen i la baixa activitat *in vitro* d'aquests productes fa pensar en la possible actuació dels fosfonats en la planta estímulant mecanismes de defensa durant la interacció amb *P. syringae*.

## BIBLIOGRAFIA

---

- ABO-FOUL, S., RASKIN, V.I., SZTEJNBERG, A., i MARDER, J.B. 1996. Disruption of chlorophyll organization and function in powdery mildew-diseased cucumber leaves and its control by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology* 86:195-199.
- ABRAHAM, B., i LEDOLTER, J. 1983. *Statistical methods for forecasting*. John Wiley & Sons (eds.). New York. 445 pp.
- ABU-HAWDAH, Y., i KUMMERT, J. 1983. Effect of Aliette on AMV infection of bean leaves and on the resultant alterations in the patterns of proteins and peroxidases. *Phytopathol. Z.* 108:294-303.
- ADAM, A., FARKAS, T., SOMLAY, G., HEVESI, M., i KIRALY, Z. 1989. Consequence of O<sub>2</sub> generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 13-26.
- ADDY, S.K. 1976. Leakage of electrolites and phenols from apple leaves caused by virulent and avirulent strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 66:1403-1405.
- AFEK, U. i SZTEJNBERG, A. 1989. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of *Citrus* to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology* 79:736-739.
- AGRIOS, G.N. 1997. *Plant Pathology*. 4a ed. Academic Press. California. USA 635 pp.
- AL-MOUSAWI, A.H., RICHARDSON, P.E., ESSENBERG, M., i JOHNSON, W.M. 1983. Specificity of the envelopment of bacteria and other particles in cotton cotyledons. *Phytopathology* 73: 484-489.
- ANDERSEN, G.L., MENKISSOGLU, O., i LINDOW, S.E. 1991. Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California. *Phytopathology* 81:648-656.
- APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F., i LOW, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 90:109-116.
- ASKARY, H., BENHAMOU, N., i BRODEUR, J. 1997. Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology* 87:359-368.

- ATKINSON, M.M., i BAKER, C.J. 1987. Association of host plasma membrane  $K^+/H^+$  exchange with multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 77:1273-1279.
- ATKINSON, M.M., HUANG, J., i KNOPP, J.A. 1985a. Hypersensitivity of suspension-cultured tobacco cells to pathogenic bacteria. *Phytopathology* 75:1270-1274.
- ATKINSON, M.N., HUANG, J.S., i KNOPP, J.A. 1985b. The hypersensitive reaction of tobacco to *Pseudomonas syringae* pv. *poti*. Activation of a plasmalemma  $K^+/H^+$  exchange mechanism. *Plant Physiol.* 79: 843-847.
- ATKINSON, M.N., KEPLER, L.D., ORLANDI, E.W., BAKER, C.J., i MISCHKE, C.F. 1990. Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial inducers of the  $K^+/H^+$  and hypersensitive response in tobacco. *Plant Physiol.* 92:215-221.
- BARKER, B.T.P., i GROVE, O. 1914. A bacterial disease of fruit blossom. *Ann. Appl. Biol.* 1: 85-97.
- BELLÉS, J.M., CARBONELL, J. i CONEJERO, V. 1991. Polyamines in plants infected by citrus exocortis viroid or treated with silver ions and ethephon. *Plant Physiol.* 96:1053-1059.
- BELLINI, E. 1993. La scelta delle cultivar di pero pp. 19-60. A: S. Fraccaroli, G. Bargioni, i A. Febi (eds.). La coltura del pero per una produzione integrata. Atti del Convegno Nazionale Verona.
- BERTRAND, A., DUCRET, J., DEBOURGE, J.C., i HORRIERE, D. 1977. Etude des propriétés d'une nouvelle famille de fongicides: les monoéthyl phosphites métalliques. Caractéristiques physico chimiques et propriétés biologiques. *Phytiatr.-Phytopharm.* 26:3-18.
- BILLING, E., CROSSE, J.E., i GARRET, C.M.E. 1960. Laboratory diagnosis of blossom blight of apple and pear. *Plant Path.* 9:19-25.
- BOHER, B., KPEMOUA, K., NICOLE, M., LUISETTI, J., i GEIGER, J. P. 1995. Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihoti*: Cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology* 85:777-788.
- BOMPEIX, G. 1989. Fongicides et relations plantes parasites: cas des phosphonates. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 75: 183-189.
- BOMPEIX, G., FETTOUCHE, F., i SAINDRENAN, P. 1981. Mode d'action du phosétyl-Al. *Phytiatr.-Phytopharm.* 30:257-272.
- BOMPEIX, G., RAVISÉ, A., RAYNAL, G., FETTOUCHE, F., i DURAND, M.C. 1980. Modalités de l'obtention des nécroses bloquantes sur feuilles détachées de tomate par l'action du tris-o-éthyl phosphonate d'aluminium (phosétyl d'aluminium), hypothèses sur son mode d'action in vivo. *Ann. Phytopathol.* 12: 337-351.
- BONATERRA, A. 1995. Aïllament, caracterització i potencial antagonista de bacteris epífits pel control biològic de *Stemphylium vesicarium* en perera. Treball de Recerca de Tercer Cicle. Universitat de Girona.
- BRADBURY, J.F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. C.A.B. International Mycological Institute. U.K. 332 pp.

- BRISSET, M.N. 1990. Recherche et mise au point de modèles de laboratoire adaptés a l'étude de l'interaction *Erwinia amylovora*-pomoidae. Thèse. Institut National Agronomique. Paris-Grignon.
- BRISSET, M.N., MANCEAU, C., DEVAUX, M. i PAULIN, J.P. 1994. Electrolyte leakage from host and non host plants associated with *hrp* genes of necrogenic bacteria. pp. 533-537. A: Plant Pathogenic Bacteria, Versailles (France), June 9-12, 1992. Ed. INRA, Paris.
- BRISSET, M.N., i PAULIN, J. P. 1991. Relationships between electrolyte leakage from *Pyrus communis* and virulence of *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39:443-453.
- BRISSET, M.N., i PAULIN, J. P. 1992. A reliable strategy for the study of disease and hypersensitive reactions induced by *Erwinia amylovora*. *Plant Sci.* 85:171-177.
- BROWN, I., MANSFIELD, J., IRLAM, I., CONRADS-STRAUCH, J., i BONAS, U. 1993. Ultrastructure of interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and pepper, including immunocytochemical localization of extracellular polysaccharides and the AvrBs3 protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:376-386.
- BURKOWICZ, A., i GOODMAN, R.N. 1969. Permeability alteration induced in apple leaves by virulent and avirulent strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 59: 314-318.
- CALZOLARI, A., PONTI, I., i LAFFI, F. 1992. Malattie Batteriche delle Piante. Edizioni L'Informatore Agrario. Verona. Italia. 103 pp.
- CAMERON, H.R. 1962. Diseases of deciduous fruit trees incited by *Ps. syringae* van Hall. Oregon Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. 66.
- CANALS, M., i DÍAZ C. 1994. Resultados de ensayos contra la bacteriosis del peral provocada por *Pseudomonas syringae* van Hall. *Phytoma España* 57:61-66.
- CAZORLA, F.M., TORES, J.A., OLALLA, L., DURAN, V.E., i DE VICENTE, A. 1997. La necrosis apical del mango: una enfermedad causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytoma España*. 86:22-30.
- CHASE, A.R. 1993. Efficacy of fosetyl-Al for control of some bacterial diseases on ornamentals. *Plant Dis.* 77: 771-776.
- CODY, Y.S., i GROSS, D.C. 1987. Outer membrane protein mediating iron uptake via pyoverdinin<sub>pss</sub>, the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* 169:2207-2214.
- COFFEY, M.D., i JOSEPH, M.C. 1985. Effects of phosphorous acid and fosetyl-Al on the life cycle of *Phytophthora cinamomi* and *P. citricola*. *Phytopathology* 75:1042-1046.
- COHEN, Y., i COFFEY, M.D. 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:311-338.
- COOK, A.A. 1973. Characterization of hypersensitivity in *Capsicum annuum* induced by the tomato strain of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology* 63:915-918.

- COOK, A.A. 1975. Effect of low concentrations of *Xanthomonas vesicatoria* infiltrated into pepper leaves. *Phytopathology* 65:487-489.
- COTTENIE, A., VELGHE, G., VERLOO, M., i KIEKENS, L. 1979. Analytical methods for plants and soils. Lab. of Analytical and Agrochemistry State University. Ghent-Belgium. 38 pp.
- DAUB, M.E., i HAGERDORN, D.J. 1981. Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* on susceptible and resistant bean lines. *Phytopathology* 71:547-550.
- DE LA CRUZ, J.I. 1991. Razones agroclimáticas de una desastrosa campaña frutícola en la Vega del Guadiana. *Fruticultura Profesional* 37: 5-15.
- DE WAARD, M.A., GEORGOPOULOS, S.G., HOLLIMON, S.G., ISHII, H., LEROUX, P., RAGSDALE, N.N., i SCHWINN, F.J. 1993. Chemical control of plant diseases: problems and prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:403-421.
- DENNY, T.P., GILMOUR, M.N., i SELANDER, R.K. 1988. Genetic diversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *J. Gen. Microbiol.* 134:1-12.
- DI-GIORGIO, D., CAMONI, L., MOTT, K.A., TAKEMOTO, J.Y., i BALLIO, A. 1996. Syringopeptins, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* phytotoxins, resemble syringomycin in closing stomata. *Plant Pathol.* 45:564-571.
- DIXON, R.A., HARRISON, M.J., i LAMB, C.J. 1994. Early events in the activation of plant defence responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:479-501.
- DOLAN, T.E., i COFFEY, M.D. 1988. Correlative in vitro and in vivo behaviour of mutant strains of *Phytophthora palmivora* expressing different resistances to phosphorous acid and fosetil-Na. *Phytopathology* 78:974-978.
- DRAPER, N.R., i SMITH, H. 1981. *Applied Regression Analysis*. John Wiley & Sons, Inc. USA. 709 pp.
- DUNSTAN, R.H., SMILLIE, R.H., i GRANT, B.R. 1990. The effects of sub-toxic levels of phosphonate on the metabolism and potencial virulence factors of *Phytophthora palmivora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 205-220.
- DYE, D.W. 1956. Blast of pear. *Orchadist N.Z.* 29:5-7.
- DYE, D.W., BRADBURY, J.F., GOTO, M., HAYWARD, A.C., LELLIOTT, R.A., i SCHROTH, M.N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.* 59:153-168.
- EL-BANOBY, F.E., RUDOLPH, K., MENDGEN, K. 1981. The fate of extracellular polysaccharide from *Pseudomonas phaseolicola* in leaves and leaf extracts from halo-blight susceptible and resistant bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol. Plant Pathol.* 18:91-98.
- EL-HAMALAWI, Z.A., i MENGE, J.A. 1994. Effect of wound age and fungicide treatment of wounds on susceptibility of avocado stems to infection by *Phytophthora citricola*. *Plant Dis.* 78:700-704.

- EL-HAMALAWI, Z.A., MENGE, J.A., i ADAMS, C.J. 1995. Methods of fosetyl-Al application and phosphonate levels in avocado tissue needed to control stem canker caused by *Phytophthora citricola*. Plant Dis. 79:770-778.
- ENDERT, E., i RITCHIE, D.F. 1984. Overwintering and survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and symptom development in peach trees. Plant Dis. 68: 468-470.
- ENGLISH, H., DEVAY, J.E., OGAWA, J.M., i LOWNSBERY, B.F. 1980. Bacterial canker and blast of deciduous fruits. Leaflet 2155:1-7. Univ. California. Davis.
- ERCOLANI, G.L. 1967. Aspetti di *Pseudomonas syringae* nei frutteti emiliani. Inf. Fitopatol. 17:205-215.
- FAHY, P.C., i LLOYD, A.B. 1983. *Pseudomonas*: the fluorescent pseudomonads. pp 141-188. A: P.C. Fahy, i G.J. Persley (eds.). Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide. Academic Press, Sidney.
- FARETRA, F., POLLASTRO, S. i SANSIVERIO, F. 1992. Activity of adjuvants in 'Aliette' against *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and their cross-resistance with benzimidazole fungicides. Pestic. Sci. 35:171-174.
- FARIH, A., TSAO, P.H., i MENGE, J.A. 1981. Fungitoxic activity of fosite aluminium on growth, sporulation, and germination of *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora*. Phytopathology 71:934-936.
- FENN, M.E., i COFFEY, M.D. 1984. Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of fosetil-Al and phosphorous acid. Phytopathology 74:606-611.
- FENN, M.E., i COFFEY, M.D. 1985. Further evidence for the direct mode of action of fosetil-Al and phosphorous acid. Phytopathology 75:1064-1068.
- FENN, M.E., i COFFEY, M.D. 1989. Quantification of phosphonate and ethyl phosphonate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of two phosphonate fungicides. Phytopathology 79: 76-82.
- FIENBERG, S.E. 1994. The analysis of cross-classified categorical data. The Massachusetts Institute of Tecnology. USA 198 pp.
- GARDAN, L., COTTIN, S., BOLLET, C., HUNAUULT, G., i BOUTEFNOUCHET, N. 1990. Variabilité phénotypique de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* provenant du laurier palme et d'hôtes variés. Agronomie 10:407-416.
- GARDAN, L., DIGAT, B., KRAUSE, A., COTTIN, S., i LEMAIRE, F. 1989. Une nouvelle maladie: La criblure bactérienne du laurier palme. P.H.M.Revue Horticole. 294:29-35.
- GOODMAN, R.N. 1972. Electrolyte leakage and membrane damage in relation to bacterial population, pH, and ammonia production in tobacco leaf tissue inoculated with *Pseudomonas pisi*. Phytopathology 62:1327-1331.
- GOODMAN, R.N., HUANG, P.Y., i WHITE, J.A. 1976. Ultrastructural evidence for immobilization of an incompatible bacterium, *Pseudomonas pisi*, in tobacco leaf tissue. Phytopathology 66:754-764.

- GOODMAN, R.N., i NOVACKY, A.J. 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens: A resistance phenomenon. American Phytopathological Society, St Paul, MN. 244 pp.
- GOPALAN, S., i HE, S. Y. 1996. Bacterial genes involved in the elicitation of hypersensitive response and pathogenesis. *Plant Dis.* 80:604-610.
- GRIFFITH, J.M., COFFEY, M.D., i GRANT, B.R. 1993. Phosphonate inhibition as a function of phosphate concentration in isolates of *Phytophthora palmivora*. *J. Gen. Microbiol.* 139:2109-2116.
- GROSS, D.C. 1991. Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:247-278.
- GROSS, D.C., CODY, Y.S., PROEBSTING, E.L., RADAMAKER, G. K., i SPOTTS, R.A. 1983. Distribution, population dynamics and characteristics of ice nucleation-active bacteria in deciduous fruit tree orchards. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1370-1379.
- GROSS, D.C., CODY, Y.S., PROEBSTING, E.L., RADAMAKER, G. K., i SPOTTS, R.A. 1984. Ecotypes and pathogenicity of ice nucleation-active *Pseudomonas syringae* isolated from deciduous fruit tree orchards. *Phytopathology* 74:241-248.
- GROSS, D.C., i CODY, Y.S. 1985. Mechanisms of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. *Can. J. Microbiol.* 31:403-410.
- GROUSSOL, J., DELROT, S., CARUHEL, P., i BONNEMAN, J.L. 1986. Design of an improved exudation method for phloem sap collection and its use for the study of phloem mobility of pesticides. *Physiol. Végét.* 24:123-133.
- GUEST, D.I. 1984. Modification of defence responses in tobacco and capsicum following treatment with fosetyl-Al (aluminium tris (o-ethyl phosphonate)). *Physiol. Plant Pathol.* 25:125-134.
- GUEST, D.I. 1986. Evidence from light microscopy of living tissues that fosetyl-Al modifies the defence response in tobacco seedlings following inoculation with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29:151-161.
- GUEST, D., i GRANT, B. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biol. Rev.* 66:159-187.
- HAYWARD, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65-87.
- HE, S.Y., HUANG, H.C., i COLLMER, A. 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin<sub>pss</sub>: A protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73:1255-1266.
- HENDLIN, D., STAPLEY, E.O, JACKSON, M., WALLICK, H., MILLER, A.K., WOLF, F.J., MILLER, T.W., CHAIET, L, KAHAN, F.M., FOLTZ, E.L., WOODRUFF, H.B., MATA, J.M., i MOCHALES, S. 1969. Phosphomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science* 66:122-123.

- HIRANO, S.S., ROUSE, D.I., CLAYTON, M.K., i UPPER, C.D. 1995. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and bacterial brown spot of snap bean: a study of epiphytic phytopathogenic bacteria and associated disease. *Plant Dis.* 79:1085-1093.
- HIRANO, S.S., i UPPER, C.D. 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:155-177.
- HIRANO, S.S., i UPPER, C.D. 1994. Autoecology of foliar pseudomonads. pp.227-243. A: J.P. Blakeman i B. Williamson (eds.). *Ecology of plant pathogens*. CAB International. U.K.
- HUANG, H.C., LIN, R.H., CHANG, C.J., COLLMER, A., i DENG, W.L. 1995. The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpin<sub>ps</sub> secretion that are arranged colinearly with *Yersinia ysc* homologs. *Plant-Microbe Interact.* 8:733-746.
- IACOBELLIS, N.S., LAVERMICOCCA, P., SURICO, G., i DURBIN, R.D. 1992. The occurrence and characterization of a syringomicin-macromolecular complex in cultures of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40:91-105.
- INNES, R.W. 1996. Plant-pathogen interactions: Unexpected findings on signal input and output. *Plant Cell* 8:133-136.
- ITIER, B., FLURA, D., BRUN, O., LUISETTI, J., GAINARD, J. L., CHOISY, C., i LEMOINE G. 1991. Analyse de la gélimité des burgeons de vigne. *Experimentation in situ sur le vignole champenois*. *Agronomie* 11:169-174.
- JACOB, G.S., GARBOW, J.R., HALLAS, L.E., KIMACK, N.M, KISHORE, G.M., i SCHAEFER, J. 1988. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2953-2958.
- JONES, A.L., i ALDWINCKLE, H.S. 1990. *Compendium of apple and pear diseases*. APS Press. St. Paul. MN. USA. 100 pp.
- KEEN, N. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24:447-463.
- KESSMAN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T., i HERZOG, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:439-59.
- KING, E.O., WARD, M.K., i RANEY, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clinic. Med.* 44:301-307.
- KLEMENT, Z. 1963. Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199:299-300.
- KLEMENT, Z. 1982. Hypersensitivity. pp. 149-177 A : M.S. Mount i G.H. Lacy (eds.). *Phytopathogenic Prokaryotes*. Vol. 2. Academic Press. New York.
- KLEMENT, Z., i GOODMAN, R.N. 1967a. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 5:17-44.



- KLEMENT, Z., i GOODMAN, R.N. 1967b. The role of the living bacterial cell and induction time in the hypersensitive reaction of the tobacco plant. *Phytopathology* 57:322-323.
- KLEMENT, Z., RUDOLPH, K., i GROSS, M. 1987. Necrosis instead of water-soaking due to light deficiency in leaves after inoculation with pseudomonads or xanthomonads. pp. 530-536. A: E.L. Civerolo, A. Collmer, R.E. Davis, i A.G. Gillaspie (eds.). *Plant Pathogenic Bacteria. Proc. VI Int. Plant Path. Bact.* 1985, Maryland, USA. Martinus Nighoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- KLEMENT, Z., i RUDOLPH, K. 1994. An explanation for symptomless "immune" response of tobacco leaves inoculated with incompatible bacteria. pp. 509-513. A: *Abstracts of Plant Pathogenic Bacteria. 8th International Conference.* Versailles, 1992. INRA Orstom Editions.
- KUNOH, H. 1990. Ultrastructure and mobilization of ions near infection sites. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:93-111.
- KUZUYAMA, T., HIDAKA, T., KAMIGIRI, K., IMAI, S., i SETO, H. 1992. Studies on the biosynthesis of fosfomycin. The biosynthetic origin of the methyl group of fosfomycin. *J. Antibiot.* 45: 1812-1814.
- LATORRE, B. A., i JONES, A. L. 1979. *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology* 69:335-339.
- LAWTON, K.A., POTTER, S.L., UKNES, S., i RYALS, J. 1994. Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* 6:581-588.
- LE LÉZEC, M., LECOMTE, P., LAURENS, F., i MICHELES, J.C. 1997. Pomiers, poiriers et porte-greffe. Sensibilité variétale au feu bactérien. *L'Arboriculture Fruitière* 505:31-40.
- LELLIOTT, R.A., BILLING, E., i HAYWARD, A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bact.* 29:470-489.
- LELLIOTT, R.A., i STEAD, E.D. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in Plant Pathology. Vol. 2.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. 216 pp.
- LINDEMANN, J., ARNY, D.C., i UPPER, C.D. 1984. Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on snap bean and nonhost plants and the incidence of bacterial brown spot disease in relation to cropping patterns. *Phytopathology* 74:1329-1333.
- LINDGREN, P.B., PEET, R.C., i PANOPOULOS, N.J. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phseolicola* controls pathogenicity on bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168:512-522.
- LINDOW, S.E. 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21:363-384.
- LINDOW, S.E. 1987. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by Ice<sup>-</sup> *Pseudomonas syringae* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2520-2527.

- LINDOW, S.E., ARNY, D.C., i UPPER, C.D. 1978. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:831-838.
- LINDOW, S.E., ARNY, D.C., i UPPER, C.D. 1982. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. *Plant Physiol.* 74:1084-1089.
- LINDOW, S.E., MCGOURTY, G., i ELKINS, R. 1996. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear. *Phytopathology* 86:841-848.
- LÓPEZ, M.M., i MONTESINOS, E. 1996. Enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. pp. 515-558. A: G. Llácer, M.M. López, A. Trapero, i A. Bello (eds.). *Patología Vegetal. Tomo 1. Sociedad Española de Fitopatología. España.*
- LÓPEZ, M.M., MONTESINOS, E., LECOMTE, P., i PAULIN, J.P. 1996. El fuego bacteriano del peral, una amenaza permanente: situación actual, epidemiología y control de la enfermedad. *Fruticultura Profesional* 78:79-87.
- LÓPEZ-SERRANO, M., FERRER, M.A., PEDREÑO, M.A., i ROS BARCELÓ, A. 1997.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions counteract the reduction by fosetyl-Al (aluminium tris (ethyl phosphonate)) of peroxidase activity from suspension-cultured grapevine cells. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* 47: 207-212.
- LUISETTI, J., GAINARD, J.L., i VIGOUROUX, A. 1983. Le dépérissement bactérien du pecher. *INRA-SPV.* 16 pp.
- LUISETTI, J., i GAINARD, J.L. 1985. Gel de printemps et bactéries glaçogènes C.R. *Acad. Agric. Fr.*
- LUISETTI, J., i GAINARD, J.L. 1987. Deux maladies bactériennes du Kiwi en France. *Phytoma* 391:42-45.
- LUISETTI, J. GARDAN, L., i PRUNIER, J.P. 1973. Étude sur les bactérioses des arbres fruitiers. VI Étude du pouvoir pathogène de *Ps. mors-prunorum* f. sp. *persicae*. Influence de la dose d'inoculum. *Ann. Phytopathol.* 5:347-353.
- LUISETTI, J., i PAULIN, J.P. 1972. Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. III. Recherche du *Pseudomonas syringae* (Van Hall) à la surface des organes aériens du poirier et étude de ses variations quantitatives. *Ann. Phytopathol.* 4:215-227.
- MADDEN, L.V., i CAMPBELL, C.L. 1990. Nonlinear disease progress curves. pp. 181-225. A: Jürgen Kranz (ed.). *Epidemics of plant diseases.* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- MALVICK, D.K., i MOORE, L.W. 1988. Population dynamics and diversity of *Pseudomonas syringae* on maple and pear trees and associated grasses. *Phytopathology* 78:1366-1370.
- MANCEAU, C., i HORVAIS, A. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:498-505.

- MANCEAU, C., LALANDE, J.C., LACHAUD, G., CHARTIER, R., i PAULIN, J.P. 1990. Bacterial colonization of flowers and leaf surfaces of pear trees. *Acta Hort.* 273:73-81.
- MANSVELT, E.L., i HATTINGH, M.J. 1986. Bacterial blister bark and blight of fruit spurs of apple in South Africa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Dis.* 70:403-405.
- MANSVELT, E.L., i HATTINGH, M.J. 1988. Resident populations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on leaves, blossoms and fruits of apple and pear trees. *J. Phytopathol.* 121:135-142.
- MARÍN, J.P. 1996. Principios generales de epidemiología y control de las micosis. pp. 771-784. A: G. Llácer, M.M. López, A. Trapero, i A. Bello (eds.). *Patología Vegetal. Tomo 2. Sociedad Española de Fitopatología. España.*
- MARSHALL, D. 1988. A relationship between ice-nucleation-active bacteria, freeze damage, and genotype in oats. *Phytopathology* 78:952-957.
- MCGUIRE, R.G. 1988. Evaluation of bactericidal chemicals for control of *Xanthomonas* on citrus. *Plant Dis.* 72:1016-1020.
- MOBLEY, R.D., SCROTH, M.N., i HILDEBRAND, D.C. 1972. 35 sulfur diffusion from bean leaves in relation to growth of *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytopathology* 62:300-301.
- MOHR, H., i SCHOPFER, P. 1995. *Plant Physiology*. Springer-Verlag. Berlin Heildeberg. 629 pp.
- MONTESINOS, E., GISPERT, M., RECAS, E., i VILARDELL, P. 1992. Assessment of key parameters for monitoring and forecasting blast of dormant flower buds in commercial pear orchards in Catalunya, Spain. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 27: 465-471.
- MONTESINOS, E., i LÓPEZ, M.M. 1996. Métodos de control de las bacteriosis. pp. 653-678. A: G. Llácer, M.M. López, A. Trapero, i A. Bello (eds.). *Patología Vegetal. Tomo 1. Sociedad Española de Fitopatología. España.*
- MONTESINOS, E., MORAGREGA, C., LLORENTE, I., i VILARDELL, P. 1995. Susceptibility of selected european pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age. *Plant Dis.* 79:471-473.
- MONTESINOS, M., VILARDELL, P., GARCÍA, E., i RECAS, E. 1987. Distribució, dinàmica poblacional i caracterització de *Pseudomonas syringae*, formadors de nuclis de gel i fitopatògens de *Pyrus communis* a les comarques gironines. *Scientia Gerundensis* 13:45-51.
- MONTESINOS, E., i VILARDELL, P. 1988. El desecamiento bacteriano del peral producido por *Pseudomonas syringae*. *Fruticultura Profesional* 18:56-59.
- MONTESINOS, E., i VILARDELL, P. 1989. On the role of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in blast of pear trees in Catalunya. Fifth International Symposium on Pear Growing. *Acta Hort.* 256:31-38.
- MONTESINOS, E., i VILARDELL, P. 1991a. Nuevos avances en el control de la necrosis de yemas de flor en el peral. *Fruticultura Profesional* 40:14-40.

- MONTESINOS, E., i VILARDELL, P. 1991b. Relationships among population levels of *Pseudomonas syringae*, amount of ice nuclei, and incidence of blast of dormant flower buds in commercial pear orchards in Catalunya, Spain. *Phytopathology* 81:113-119.
- MONTESINOS, E., i VILARDELL, P. 1996. La necrosis de yemas de flor en el peral. Una enfermedad de etiología compleja y difícil control. *Fruticultura Profesional* 78:88-94.
- MORAGREGA, C. 1994. Efecte de paràmetres ambientals, l'hoste i el patogen en la infecció de *Stemphylium vesicarium* i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* en perera. Treball de recerca de Tercer Cicle. Universitat de Girona.
- MORENO, R. 1994. El papel de la epidemiología en la protección fitosanitaria. pp. 263-276. A: Sanidad Vegetal en la Horticultura Protegida. Junta de Andalucía. Sevilla.
- MUCCINELLI, M. 1997. Prontuario dei fitofarmaci. Edagricole-Edizioni Agricole. Bologna. 905 pp.
- MURILLO, J., i RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. 1996. Biología molecular de las interacciones entre plantas y bacterias fitopatógenas. pp. 559-586. A: G. Llácer, M.M. López, A. Trapero, i A. Bello (eds.). Patología Vegetal. Tomo 1. Sociedad Española de Fitopatología. España.
- NEMESTOTHY, G., i GUEST D.I 1990. Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37:207-219.
- OELLER, P.W., MIN-WONG, L., TAYLOR, L.P., PIKE, D.A., i THEOLOGIS, A. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254:437-439.
- OUCHI, S. 1983. Induction of resistance or susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21:289-315.
- OUIMETTE, D.G., i COFFEY, M.D. 1988. Quantitative analysis of organic phosphonates, phosphonate, and other inorganic anions in plants and soil by using high-performance ion chromatography. *Phytopathology* 78:1150-1155.
- OUIMETTE, D.G., i COFFEY, M.D. 1989. Comparative antifungal activity of four phosphonate compounds against isolates of nine *Phytophthora* species. *Phytopathology* 79: 761-767.
- OUIMETTE, D.G., i COFFEY, M.D. 1990. Symplastic entry and phloem translocation of phosphonate. *Pestic. Biochem. Physiol.* 38:18-25.
- OVOD, V., ASHORN, P., YAKOVLEVA, L., i KROHN, K. 1995. Classification of *Pseudomonas syringae* with monoclonal antibodies against the core and O-side chains of the lipopolysaccharide. *Phytopathology* 85:226-232.
- PALAZÓN, I. 1986. Problemática de las bacteriosis de los frutales. *Fruticultura Profesional* 5:83-86.

- PALLERONI, N.J. 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula I. pp. 141-199. A: N.R., Krieg, i J.G. Holt (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore.
- PANAGOPOULOS, C.G., i CROSSE, J.E. 1964. Frost injury as a predisposing factor in blossom blight of pear caused by *Pseudomonas syringae* van Hall. Nature 202:1352.
- PAULIN, J. P., CHARTIER, R., LECOMTE, P., BRISSET, M.N., LACHAUD, G., i LAURE, P. 1990. Experiments with Alette (Phosetyl-Aluminium) in fire blight control. Acta Hort. 273: 383-389.
- PICTON, S., BARTON, S.L., BOUZAYEN, M., HAMILTON, A.J. i GRIERSON, D. 1993. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. Plant J. 3:469-481.
- PIKE, S., POPHAM, P., NOVACKY, A., i FREEMAN, J. 1992. Intracellular pH alterations during bacterial HR: a confocal laser scanning microscopy study. (Abstr.) Phytopathology 82:1165.
- POLITIS, D.J., i GOODMAN, R.N. 1978. Localized cell wall appositions: Incompatibility response of tobacco leaf cells to *Pseudomonas pisi*. Phytopathology 68:309-316.
- PRESTON, G., HUANG, H.C., HE, S.Y., i COLLMER, A. 1995. The hrp z proteins of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *glycinea* and *tomato* are encoded by an operon containing *Yersinia ysc* homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not in soybean. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:717-732.
- RAHME, L.G., MINDRINOS, M.N., i PANOPOULOS, N.J. 1991. Genetic and transcriptional organization of the *hrp* cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. J. Bacteriol. 173:575-586.
- REEVES, D.S. 1994. Fosfomicin trometamol. J. Antimicrob. Chemother. 34:853-858.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17:208-213.
- RIDÉ, M., i SUTIC, D. 1957. Un dessèchement des pousses du poirier d'origine bactérienne. C.R. Acad. Agric. Fr. 44:384-387.
- ROOS, I.M.M., i HATTINGH, M. J. 1986. Pathogenic *Pseudomonas* spp. in stone fruit buds. Phytophylactica 18:7-9.
- ROUSE, D.I., NORDHEIM, E.V., HIRANO, S.S., i UPPER, C.D. 1985. A model relating the probability of foliar disease incidence to the population frequencies of bacterial plant pathogens. Phytopathology 75:505-509.
- ROVIRA, R. 1981. Un paràsit preocupant en els perers de Girona. Butlletí del Col·legi d'Enginyers Tècnics Agrícoles de Catalunya. 8:22-23.
- RUDOLPH, K. 1994. Role of toxins and polysaccharides in bacterial pathogenesis. pp.477-484. A: Abstracts of Plant Pathogenic Bacteria 8th International Conference. Versailles, 1992. INRA Orstom Editions.

- RUDOLPH, K.W.E., GROSS, M., NEUGEBAUER, M., HOKAWAT, S., ZACHOWSKI, A., WYDRA, K., i KLEMENT, Z. 1989. Extracellular polysaccharides as determinants of leaf spot diseases caused by pseudomonads and xanthomonads. pp. 177-218. A: A. Graniti, R. Durbin, i A. Ballio (eds.). Phytotoxins and Plant Pathogenesis. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- SANDS, D.C., SCROTH, M.N., i HILDEBRAND, D.C. 1970. Taxonomy of phytopathogenic pseudomonads. J. Bacteriol. 101:9-23.
- SANSAVINI, S., ASIRELLI, A., LUGLI, S., i RIVALTA, L. 1997. Le cultivar de pero e nashi. Rivista di Fruticoltura 4:39-44.
- SAS INSTITUTE INC. 1989. JMP User's Guide. Cary, N.C. USA. 584 pp.
- SAUNIER, M., MALANDRIN, L., i SAMSON, R. 1996. Distribution of *Pseudomonas syringae* pathovars into twenty-three O serogroups. Appl. Environ. Microbiol. 62:2360-2374.
- SCHAAD, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd Edition. American Phytopathological Society Press. St. Paul. MN. 164 pp.
- SCHECK, H.J., PSCHIEDT, J.W., i MOORE, L.W. 1996. Copper and streptomycin resistance in strains of *Pseudomonas syringae* from Pacific Northwest nurseries. Plant Dis. 81:1034-1039.
- SCHERM, H., KOIKE, S.T., LAEMMLEN, F.F., i VAN BRUGGEN, A.H.C. 1995. Field evaluation of fungicide spray advisories against lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) based on measured or forecast morning leaf wetness. Plant Dis. 79:511-516.
- SEQUEIRA, L. 1985. Surface components involved in bacterial pathogen-plant host recognition. J. Cell Sci. Suppl. 2:301-316.
- SHAW, J.J., i KADO, C.I. 1988. Whole plant wound inoculation for consistent reproduction of black rot of crucifers. Phytopathology 78:981-986.
- SIGEE, D.C., i EPTON, H.A.S. 1975. Ultrastructure of *Pseudomonas phaseolicola* in resistant and susceptible leaves of French bean. Physiol. Plant Pathol. 6:29-34.
- SINDEN, S.L., DEVAY, J.E., i BACKMAN, P.A. 1971. Chemical nature of the antibiotic produced by *Pseudomonas syringae* in culture and its role as a phytotoxin in the bacterial canker disease of peach trees. Physiol. Plant Pathol. 1:199-213.
- SOKAL, R.R., i ROHLF, F.J. 1981. Biometry. W.H. Freeman and Company. USA. 859 pp.
- SOME, A., i SAMSON, R. 1991. Critères protéiques et enzymatiques pour la caractérisation des *Pseudomonas* fluorescents phytopathogènes. C.R. Acad. Sci. Paris 312:203-208.
- SPOTTS, R.A., i CERVANTES, L.A. 1995. Copper, oxytetracycline, and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. Plant Dis. 79:1132-1135.

- STEAD, D.E. 1992. Grouping plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acids profiles. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:281-295.
- SZKOLNIK, M., i HICKEY, K.D. 1986. Testing chemical sprays on blossoms of deciduous fruit trees. pp. 112-115. A: K.D. Hickey (ed.). *Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens.* American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA.
- TAMURA, K., TERAOKA, T., HOSOKAWA, D., i WATANABE, M. 1994. Some pathovars of *Pseudomonas syringae* producing syringomycin-like toxin. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 60:478-482.
- UTKHEDE, R., i SMITH, E. 1995. Control of *Phytophthora* crown and root rot of apple trees with fosetyl-Aluminium in new plantings. *Pestic. Sci.* 45:117-122.
- VAN KAN, J. A. L., COZIJSSEN, T., DANHASH, N., i DE WIT, P.J.G.M. 1995. Induction of tomato stress protein mRNAs by ethephon, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylate. *Plant Mol. Biol.* 27:1205-1213.
- VAN ZYL, E., i STEIN, P.L. 1990. Differentiation of phytopathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species and pathovars by numerical taxonomy and protein gel electrophoregrams. *Syst. Appl. Microbiol.* 13:60-71.
- VEGA, J., SCAGLIUSI, S.M.M., i ULIAN, E.C. 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence of association with a luteovirus. *Plant Dis.* 81:21-26.
- VIGOUROUX, A. 1979. Incidence des basses températures sur la sensibilité du pêcher au dépérisement bactérien (*Pseudomonas mors-prunorum* f.s. *persicae*). *Ann. Phytopathol.* 11:231-239.
- VILARDELL, P. GISPERT, M., i MONTESINOS, E. 1991. Problemática y perspectivas de control de la anulación de yemas de flor en el peral. El peral y el nashi. Editorial AEDOS-Fundación La Caixa. 94 pp.
- WACKETT, L.P., SHAMES, S.L., VENDITTI, C.P., i WALSH, C.T. 1987. Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. *J. Bacteriol.* 169:710-717.
- WAISSBLUTH, M.E., i LATORRE, B.A. 1978. Source and seasonal development of inoculum for pear blast in Chile. *Plant Dis. Rep.* 62:651-655.
- WEHNER, F.C., SMITH, E.M., BARNARD, R.O., i KOTZE, J.M. 1987. Control of crater disease of wheat, caused by *Rhizoctonia solani*, using metalaxyl and phosphorous acid. *Phytophylactica* 19:495-498.
- WEINGART, H., i VÖLKSCH, B. 1997. Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars *in vitro* and *in planta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:156-161.
- WERNER, D.J., RITCHIE, D.F., CAIN, D.W., i ELTON, I.Z. 1986. Susceptibility of peaches and nectarines, plant introductions, and other *Prunus* species to bacterial spot. *Hort Sci.* 21:127-130.
- WHEELER, H. 1975. *Plant Pathogenesis.* Springer-Verlag. New York.
- WHITESIDES, S.K., i SPOTTS, R.A. 1991. Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathology* 81:453-457.

- WILD A. 1973. Russell's Soil Conditions and Plant Growth. Longman Scientific and Technical, New York. 991 pp.
- WILLIAMS, P.H., i KEEN, N.T. 1967. Relation of cell permeability alteration to water congestion in cucumber angular leaf spot. *Phytopathology* 57:1378-1385.
- WILSON, E.E. 1936. Symptomatic and etiologic relations of the canker and the blossom blast of *Pyrus* and the bacterial canker of *Prunus*. *Hilgardia* 10:213-240.
- WIMALAJEWA, D.L.S. 1987. Seasonal variation in susceptibility of apricot to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (bacterial canker), and sites of infection in apricot and cherry. *Aust. J. Exp. Agric.* 27:475-479.
- WIMALAJEWA, D.L.S., i FLETT, J.D. 1985. A study of populations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on stonefruits in Victoria. *Plant Pathol.* 34:248-254.
- YANKOFSKY, S.A., LEVIN, Z., i MOSHE, A. 1981. Association with citrus of ice-nucleating bacteria and their possible role as causative agents of frost damage. *Curr. Microbiol.* 5:231-217.
- YESSAD, S. MANCEAU, C., i LUISETTI, J. 1992. A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. *Plant Dis.* 76:370-373.
- YOUNG, J.M., DYE, D.W., BRADBURY, J.F., PANAGOPOULUS, C.G., i ROBBS, C.F. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N. Z. J. Agric. Res.* 21:153-177.
- YOUNG, J.M., JONES, D.S., i GILLINGS, M. 1996. Relationships between populations of *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* determined by restriction fragment analysis. *Plant Pathol.* 45:350-357.
- ZBOINSKA, E., LEJCAK, B., i KAFARSKI, P. 1992. Organophosphonate utilization by the wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2993-2999.
- ZHANG, J.H., QUIGLEY, N.B., i GROSS, D. C. 1995. Analysis of the *syrB* and *syrC* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by thiotemplate mechanism. *J. Bacteriol.* 177:4009-4020.
- ZIEGLER, W., POKORNY, J., i KMET, T. 1994. Syringotoxin action on the membrane level. pp. 615-620. A: Abstracts of Plant Pathogenic Bacteria 8th International Conference. Versailles, 1992. INRA Orstom Editions.