

Treball final de grau

Estudi: Grau en Enginyeria Agroalimentària

Títol: Optimització de la producció de bacteriocines amb activitat antimicrobiana en cultius de *Pantoea spp.*

Document: Memòria

Alumne: Marc Cuesta Vendrell

Tutor: Anna Bonaterra Carreras

Departament: ENGINYERIA QUÍMICA, AGRÀRIA I TECNOLOGIA
AGROALIMENTÀRIA

Àrea: PRODUCCIÓ VEGETAL

Convocatòria (mes/any): 09/2018

Agraïments

En primer lloc m'agradaria expressar el meu agraïment a la Dra. Anna Bonaterra, tutora del treball, per el seu constant suport, orientació, paciència i dedicació durant la trajectòria del treball, tant experimental com escrita. També agrair el repte que ha suposat realitzar el meu treball final de grau en el departament de Patologia Vegetal-CIDSAV de l'UdG, en un grup de recerca que m'ha permès enriquir-me en nous camps de coneixement.

Agrair sobretot la gran paciència de la Núria Daranas, els coneixements transmesos, els bons consells i els dubtes resolts.

A la Alba Carmona un especial agraïment pel suport moral durant totes les tardes al laboratori des d'inicis d'any, les bones paraules, positivat i la bona germanor transmesa durant el temps compartit al laboratori.

També destacar la Carla Ochoa que vam compartir moments junts durant el treball com també el recolzament obtingut durant tota la carrera.

Finalment, donar les gràcies a totes les persones que em van ajudar durant la realització d'aquest treball i també les persones que em van ajudar durant tota la vida universitària.

Índex

Agraïments	3
Índex	4
1. Introducció	5
1.1 El foc bacterià.....	5
1.2 Maneig de la malaltia	7
1.3 <i>Pantoea spp.</i>	9
1.3.1 Mètodes d'identificació	10
1.3.2 Metabòlits antimicrobians.....	11
2. Antecedents	14
3. Objectius	15
4. Material i mètodes	16
4.1 Medis de cultiu.....	16
4.2 Soques utilitzades i cultiu	17
4.3 Identificació de soques.....	18
4.3.1 Extracció d'ADN.....	18
4.3.2 Amplificació mitjançant PCR del gen 16s ARNr	18
4.3.3 Amplificació mitjançant qPCR.....	20
4.4 Producció de sobrenedants sense cèl·lules de cultius de <i>Pantoea</i> ... 21	
4.5 Separació de fraccions de sobrenedant amb activitat inhibidora.....	23
5. Resultats	25
5.1 Identificació dels aïllats.....	25
5.2 Optimització de la producció de pantocina A.....	28
5.3 Cromatografia.....	32
6. Discussió	33
7. Conclusions	38
8. Bibliografia	39
Annex 1: Origen de les soques EPS	43
Annex 2: Soques de referència	49
Annex 3: Reactius i medis complementaris	50

1. Introducció

1.1 El foc bacterià

El foc bacterià és una malaltia de quarantena causada pel bacteri *Erwinia amylovora* que afecta principalment als fruiters de llavor com la pomera, perera i codonyer i altres plantes ornamentals de la família de les Rosàcies (Taula 1). La malaltia es considera com una de les més greus dels arbres fruiters de la família de les Rosàcies, ja que afecta espècies de gran interès econòmic, tot i que és difícil determinar el seu impacte econòmic real. A l'estat espanyol l'any 2017 es van produir un total de 4.905.824 tones de fruita de les quals 1.345.985 tones (429.626 tones a Catalunya) corresponen a fruiters que es podrien veure afectats pel foc bacterià. Per tant la producció anual, estatal, de fruita que es pot veure afectada per aquesta malaltia suposa un 27% (Ministerio Agricultura, 2018a).

Taula 1 Espècies de plantes afectades pel foc bacterià establertes en la Directiva (UE) 2000/29

Arbre fruiter	Planta ornamental
<i>Eriobotrya spp. (Nesprer japonès)</i>	<i>Amelanchier spp.</i>
<i>Cydonia spp. (Codonyer)</i>	<i>Chaenomeles spp.</i>
<i>Malus spp. (Pomera)</i>	<i>Crataegus spp.</i>
<i>Mespilus spp. (Nesprer europeu)</i>	<i>Sorbus spp.</i>
<i>Pyrus spp. (Perera)</i>	<i>Pyracantha spp.</i>
<i>Prunus spp. (Prunera)</i>	<i>Cotoneaster spp.</i>

Els primers símptomes de la malaltia solen donar-se a la primavera, amb necrosis de flors i enfosquiment dels brots tendres que presenten una curvatura característica (forma de gaiata de pastor). Les fulles dels arbres afectats presenten un aspecte cremat. Els símptomes se solen localitzar amb freqüència en la zona mitjana baixa de l'arbre, tant a la perifèria com en l'interior. La malaltia avança a través de les branques i el tronc, provocant xancre, que ràpidament poden causar la mort de la planta o poden servir al patogen com a mode de supervivència durant l'hivern per a originar noves infeccions a

la primavera. En algunes ocasions i amb temps temperat i humit es produeixen exsudats mucosos amb coloració groguenca o blanquinosa, que contenen gran quantitat de bacteris, els quals suposen un factor important de dispersió. La proliferació i velocitat dels símptomes depenen del clima favorable, sensibilitat de la planta i quantitat de bacteris presents. El bacteri pot arribar a provocar la mort de la planta en un curt període de temps. A més, té una gran facilitat per a la dispersió, ja que s'ha demostrat que pot ser propagada per insectes i altres factors (Palacio *et al.*, 2009; Cambra *et al.*, 2012; Van der Zwet, Orolaza-Halbrendt i Zeller, 2012; Generalitat de Catalunya, 2017).

La malaltia va ser descrita per primer cop l'any 1780 a Nova York. Tot i que és una de les malalties bacterianes de plantes més estudiades, continua sent un dels problemes més greus que presenten els arbres fruiters com la perera o la pomera. La malaltia es troba àmpliament distribuïda en totes les zones de clima temperat del món. L'estat espanyol durant molts anys s'havia considerat zona lliure d'aquest organisme nociu. No obstant des que l'any 2011 algunes comunitats autònomes van perdre el reconeixement de zona protegida ja que la malaltia es va establir en el territori. Les comunitats que preserven totalment o parcialment la consideració de zona protegida són Galícia, Astúries, Cantàbria, Illes Balears, País Basc, País Valencià i Catalunya. Sent aquestes 3 últimes comunitats parcialment protegides (Van der Zwet, Orolaza-Halbrendt i Zeller, 2012; Ministerio de Agricultura, 2018a; Ministerio de Agricultura, 2018b)

Pel que fa a Catalunya el primer focus detectat va ser l'any 1998 a Lleida i el 2007 a la zona fructícola de Girona. L'any 2017 es va detectar un altre focus al municipi de Santa Coloma de Farners.

En tots aquests focus es van adoptar mesures d'eradicació, i es van realitzar prospeccions de detecció del patogen en les parcel·les veïnes susceptibles al llarg de dos anys. A la demarcació de Lleida l'avanç de la malaltia va superar els dos anys, el que va causar la pèrdua de la consideració de zona protegida a les Comarques de Segrià, la Noguera, les Garrigues i el Pla d'Urgell a causa de forta presència del patogen. Segons el que estableix el RD 58/2005 les mesures de contenció de la malaltia en les parcel·les afectades situades en zones de seguretat (zona lliure del patogen) consisteixen a

delimitar una zona de seguretat al voltant del focus detectat d'una extensió mínima d'un km de radi i realitzar un seguiment intensiu. En cas de presència de la malaltia les actuacions a dur a terme són: (i) l'arrencada i destrucció immediata de tota planta hoste amb símptomes, i (ii) l'extirpació i destrucció immediata de les parts de la planta hoste amb símptomes, mitjançant el tall efectuat, almenys, a 40 centímetres del límit proximal visible de la infecció i amb desinfecció immediata de l'instrumental emprat (Generalitat de Catalunya, 2017).

1.2 Maneig de la malaltia

Assolir un maneig del foc bacterià efectiu és extremadament difícil, ja que no hi ha tractaments curatius disponibles. L'estratègia preferida es basa en la utilització de mesures preventives que permeten evitar l'arribada i dispersió del patogen.

Primerament, disposar d'una legislació adequada que reguli el moviment de material vegetal entre països és essencial per evitar la introducció i dispersió de patògens de quarantena en una àrea determinada. La legislació vigent ve determinada pel Reial decret 58/2005 i directiva 2000/29 que especifiquen la normativa per a la introducció de material vegetal en la Unió Europea o el seu desplaçament a través d'aquesta. Aquesta legislació estableix els requisits que s'han de complir per a rebre el passaport fitosanitari ZP (Zona Protegida), necessari per al desplaçament de plantes, pol·len i part de les plantes. També regula el procediment a seguir davant la detecció d'un nou focus d'infecció i determina els controls fitosanitaris per a detectar possibles infeccions latents. També es disposa del RD 1201/1999, RD 246/2010 i RD 1786/2011 que estableixen una legislació específica per a les Rosàcies.

Els mètodes preventius emprats actualment pel maneig de la malaltia es limiten a la utilització de cultivars resistents o poc susceptibles, diverses pràctiques culturals i tractaments amb plaguicides químics i/o biològics amb el suport de models de predicció de risc d'infecció.

Les pràctiques culturals més utilitzades són l'eliminació manual de la floració secundària, realització de la poda en parada vegetativa i que permeti una bona aireació de la planta, controlar la fertilització per evitar excés de vigor de les plantes i la crema de les restes de poda i evitar el reg per aspersió (Cambra *et al.*, 2012). Totes elles són indispensables com a mesures per reduir el risc d'infecció i el nivell d'inòcul del patogen.

Els productes químics disponibles per a la realització de tractaments preventius contra el foc bacterià són els derivats cúprics i els antibiòtics. Els derivats cúprics tenen efecte microbicida per acció directa enfront *E. amylovora*. No obstant això, presenten limitacions com una baixa persistència, baixa penetració en la planta i risc de fitotoxicitat especialment durant la floració. Només es poden realitzar tres aplicacions a l'any i només des de la collita fins a la floració. Pel que fa als antibiòtics inhibeixen la multiplicació d' *E. amylovora* i tenen una eficàcia elevada d'entre el 70 i 90% però no estan autoritzats a la Unió Europea (Directiva Europea 128/2009, Reglament 1107/2009) i alguns estudis determinen que tenen facilitat per seleccionar poblacions de patògens resistents (Palacio *et al.* 2009)

Hi ha altres productes alternatius efectius contra malalties de plantes causades per bacteris com les matèries actives prohexadiona-Ca, acibenzolar-S-methyl, i harpina. Aquests actuen com a inductors de defenses de les plantes, reduint la susceptibilitat de les plantes a la infecció del patogen (Ministerio de Agricultura, 2018c). En quant als bioplaguicides pel control de les bacteriosis només existeixen alguns productes autoritzats (p.e. a base de *Bacillus* spp. i *Aureobasidium pullulans*). No obstant, tenen l'inconvenient de tenir una eficàcia reduïda pel que existeix una necessitat urgent de desenvolupar nous compostos.

En el camp de nous compostos pel desenvolupament de productes bactericides, els pèptids ofereixen unes bones expectatives d'utilització. Aquests compostos presenten avantatges interessants com elevada activitat (antimicrobiana o estimuladora de defenses, entre altres), baixa toxicitat i elevada biodegradabilitat. D'acord amb aquestes propietats els pèptids s'adeqüen a les exigències de la nova legislació d'ús sostenible de productes fitosanitaris. Alguns d'aquests compostos alteren la permeabilitat de la membrana plasmàtica de les cèl·lules patògenes sensibles, provocant l'alliberament

d'ions, ATP intracel·lular i diversos compostos de baix pes molecular. Aquestes alteracions provoquen la mort cel·lular del bacteri patogen (Carmona, 2016).

Els pèptids es poden obtenir per aïllament de la font natural corresponent o bé per síntesi química. Algunes de les fonts de compostos peptídics que es podrien obtenir per fermentació podrien ser les espècies *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. o *Pantoea agglomerans*. Totes aquestes espècies tenen potencial de produir pèptids d'interès per ús en agricultura en la protecció de cultius. Entre ells hi ha les bacteriocines produïdes pels bacteris de l'àcid làctic (BAL) que han sigut objecte de molts estudis. Es tracta de pèptids o proteïnes de baix pes molecular (normalment 30-60 aminoàcids) i es classifiquen en tres grans grups: classe I o lantibiòtics, classe II, comprenen petits pèptids estables al tractament tèrmic com plantaricines, pediocines, leucocines i lactococines i classe III que inclouen pèptids de cadena llarga. Les bacteriocines tenen tant activitat bactericida com a bacteriostàtica enfront espècies relacionades (sobretot bacteris Grampositius), però també enfront bacteris Gramnegatius i fongs. Un altre grup amb molt potencial el constitueixen els ciclolipopèptids produïts per *Bacillus* spp classificats en tres famílies de lipopèptids, surfactines (i.e., halobacillina, pumilacidina i surfactina), iturines (bacilomicina D/F/L/Lc, iturina A/C, i micosubtilina), i fengicinas (fengicina A/B/S). Aquests compostos presenten activitat antimicrobiana (fengicines), a més d'activitat estimuladora de defenses en plantes (surfactines, fengicines i iturines). Altres bacteriocines amb activitat antimicrobiana descrites són les pantocines i herbicolines produïdes per *Pantoea* spp.

1.3 *Pantoea* spp.

El gènere *Pantoea* spp. és un grup de bacteris gram-negatius de la família de les Enterobacteriàcies, no esporulats, amb metabolisme fermentatiu. Habitualment es troben formant part de la microbiota epífita d'un gran nombre d'espècies vegetals, encara que també s'han trobat en ambients aquàtics, el sòl i en sediments i fins i tot en alguns aïllaments d'origen clínic (Rezzonico *et al.*, 2009; Braun-Kiewnick *et al.*, 2012).

Algunes de les soques de *Pantoea* spp. s'han utilitzat com a agents de biocontrol efectius enfront malalties bacterianes que afecten els fruiters, com el foc bacterià (Moreno, 2006) i també enfront fongs causants de podridures en postcollita. Hi ha diverses soques descrites per la seva eficàcia enfront el foc bacterià, concretament *P. agglomerans* E325, P10c i *P. vagans* C9-1 en base a les quals s'han desenvolupat diversos bioplaguicides comercialitzats en països com els Estats Units i Canadà.

Els mecanismes d'acció responsables de la supressió de la malaltia descrits a *Pantoea* spp. són la competència pels nutrients, l'exclusió competitiva del patogen i finalment la producció de compostos antimicrobians com els àcids orgànics i pèptids antimicrobians (Puchades, 2017).

1.3.1 Mètodes d'identificació

La identificació de les espècies de *Pantoea* es pot realitzar a partir de característiques fenotípiques i genotípiques.

Els mètodes d'identificació fenotípica parteixen de la determinació de la mida, morfologia cel·lular i de les colònies i la presència o absència de determinades activitats enzimàtiques, vies metabòliques, creixement amb presència d'inhibidors, a temperatures determinades, etc.

La identificació a partir d'aquest mètodes es difícil i pot induir a errors a causa de l'alt grau de similitud fenotípica entre les espècies del gènere (Brady et al., 2007).

Els mètodes moleculars es basen en l'estudi del material genètic i permeten la identificació d'una manera més eficient i sense dependre de les característiques fenotípiques.

Per a la identificació dels bacteris s'utilitza la seqüència del gen ARNr 16S. Es tracta d'un gen de distribució universal que s'utilitza per a estudis filogenètics de bacteris. La

seqüència d'aquest gen presenta aproximadament 1503 pb. Aquesta mida presenta suficient polimorfisme interespecífic que li permet diferenciar les espècies entre elles.

Un altre seqüència utilitzada per a la identificació de bacteris és el gen *gyrB*. Es tracta d'un gen de distribució universal que permet la discriminació i identificació d'espècies fortament relacionades. Es tracta d'un marcador molecular de gran utilitat en la sistemàtica bacteriana. Aquest gen codifica la subunitat β de l'ADN girasa i està implicat en la replicació de l'ADN bacterià.

També es pot realitzar la identificació de bacteris mitjançant la detecció de gens específics, mitjançant amplificació per PCR utilitzant encebadors específics. Per exemple, s'ha descrit la seqüència específica *pagR2* com adequada per a la identificació de *Pantoea agglomerans* amb una elevada especificitat (Braun-Kiewnick et al., 2012).

1.3.2 Metabòlits antimicrobians

Les soques de *Pantoea* spp. produeixen varietat de metabòlits antimicrobians com els àcids orgànics i els pèptids antimicrobians. Entre aquests darrers destaquen les pantocines i les dapdiamides amb activitat inhibidora enfront *E. amylovora* (Wright et al., 2001; Kamber et al., 2012). El mode d'acció d'aquests compostos es basa en interferir en processos clau del metabolisme bacterià com per exemple les rutes de biosíntesi d'aminoàcids o en la formació de la paret cel·lular. Es comporten com anàlegs de substrats provocant que els enzims diana quedin inactivats.

Pantocina A

La pantocina A presenta una estructura semicíclica com es mostra en la figura 1. Es tracta d'un tripètid no ribosomal. Per a la seva síntesi requereix els gens *paaP* que és el que permet codificar la Pantocina. També requereix els gens *paaA* i *paaB* que codifiquen dos enzims essencials per a la ciclació el pèptid i el gen *paaC* que li dona immunitat al propi bacteri.

La pantocina A actua bloquejant la ruta de síntesi de la L-histidina mitjançant la inhibició competitiva de l'enzim L-histidinol fosfat aminotransferasa, que catalitza la reacció d'amidació reductora del imidazol acetol 3-fosfat.

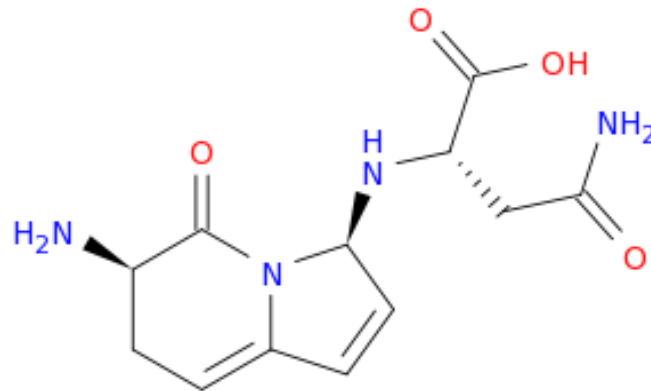


Figura 1 Estructura pantocina A (Mol-Instincts, 2018)

Pantocina B

La pantocina B també es tracta d'un tripètid no ribosomal que presenta una estructura lineal amb un grup metilo sulfur com s'observa en la figura 2. Per a la seva síntesi no s'han determinat els gens implicats.

La pantocina B interfereix en la ruta de síntesi de l'arginina com anàleg del substrat de la N-acetilornitinasasa competint pel lloc de la unió amb l'N-acetolnitrina.

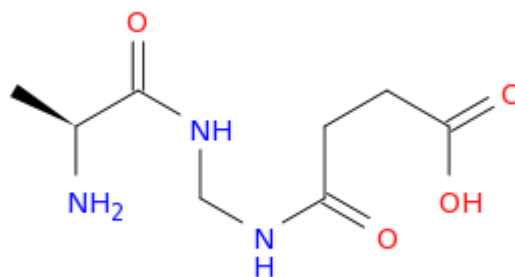


Figura 2 Estructura pantocina B (Mol-Instincts, 2018)

Dapdiamides

Les dapdiamides pertanyen al grup dels pèptids antimicrobians no ribosomals. La seva síntesi no s'ha determinat amb claredat. Se sap que impedeixen que la fructosa-6-fosfat

passi a glucosamina-6-fosfat que és una molècula que està implicada en la formació de la paret cel·lular (Pusey, Stockwell and Rudell, 2008; Hollenhorst, Clardy and Walsh, 2009; Puchades, 2017).

2 Antecedents

L'excés en la utilització de plaguicides per la protecció dels cultius ha impulsat canvis en les regulacions de l'ús de fitosanitaris a la Unió Europea (Directiva 128/2009 d'ús sostenible de plaguicides y el Reglament (CE) 1107/2009) els governs europeus s'han preocupat de limitar i avaluar de forma permanent els límits màxims de residus de plaguicides en tots els aliments destinats a l'alimentació humana i animal per a la seva seguretat (EFSA, 2018).

Això ha fet que els plaguicides tradicionals vegin restringits la seva utilització causant en algun cas la seva prohibició. Provocant una necessitat de desenvolupar nous mètodes pel maneig de les malalties com els plaguicides d'origen biològic.

En aquest context, el grup de Patologia Vegetal-CIDSAV (PV-CIDSAV) ha realitzat estudis amb l'objectiu general de desenvolupar i aplicar tecnologies innovadores i sostenibles per al maneig de malalties (bacterianes i fúngiques) de les plantes. Concretament, una de les línies de recerca pretén desenvolupar nous productes fitosanitaris basats en pèptids antimicrobians. Aquests presenten avantatges interessants com elevada activitat antimicrobiana, baixa toxicitat, i elevada biodegradabilitat, i es poden obtenir per síntesi química o a partir de microorganismes productors. El grup de recerca disposa d'una col·lecció de soques bacterianes de diferents espècies amb potencial com a productores de pèptids antimicrobians. En concret en un estudi anterior es va plantejar la possibilitat d'obtenir pèptids antimicrobians produïts per bacteris del gènere *Pantoea* (Puchades, 2017). Es va partir d'una col·lecció d'unes 200 soques de *Pantoea*, procedents de mostres de fruiters (fulles, flors, borrons) i es va avaluar quines soques presentaven els gens responsables de la síntesi de pantocina A, pantocina B i dapdiamides. Únicament 11 soques de 194 presentaven els gens de producció de pantocina A i activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora*. Es va confirmar que l'activitat era deguda a compostos sintetitzats actius ja que els sobrenedants sense cèl·lules obtinguts dels cultius inhibien el patogen.

3. Objectius

En el present treball es pretén identificar mitjançant tècniques moleculars les soques de *Pantoea* spp. de la col·lecció PV-CIDSAV. A més, es vol posar a punt una metodologia per a l'obtenció de sobrenedants amb activitat antimicrobiana a partir de cultius de *Pantoea* spp. Finalment, es pretén purificar els pèptids antimicrobians a partir dels sobrenedants. Els objectius concrets d'aquest treball han estat:

- Identificar les soques de *Pantoea agglomerans* de la col·lecció de PV-CIDSAV.
- Optimitzar les condicions de producció de sobrenedants amb activitat antimicrobiana en cultius de les soques de *Pantoea* seleccionades.
- Separar fraccions amb activitat antimicrobiana de sobrenadants de cultius de *Pantoea* per a la posterior caracterització.

4. Material i mètodes

4.1 Medis de cultiu

Per a la realització de l'estudi es van utilitzar diversos medis de cultiu, els principals medis es troben recollits en la taula 2.

Taula 2 Composició dels medis de cultius utilitzats

<i>Medi</i>	<i>Composició</i>
<i>Agar Luria Bertani (LB)</i>	10 g Triptona 5 g Extracte de llevat 10 g NaCl 15 g Agar 1000 mL Aigua destil·lada
<i>GA</i>	1000 mL Aigua destil·lada 11,5 g K ₂ HPO ₄ 4,5 g KH ₂ PO ₄ 0,12 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 20 g Agar 20 g Glucosa* 0,3 g L-Asparagina * 0,05 g Àcid nicotínic * *S'afegien després d'autoclavar
<i>Medi mínim (MM)</i>	2,4 g Na ₂ HPO ₄ 3 g K ₂ HPO ₄ 0,2 g MgSO ₄ *7H ₂ O 5 g Glucosa 1 g NH ₄ Cl 0,5 g NaCl 1000 ml Aigua destil·lada

4.2 Soques utilitzades i cultiu

Es va partir de 194 soques (annex 1) de la col·lecció del grup de Patologia Vegetal-CIDSAV de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (UdG) i 6 soques de referència del gènere *Pantoea* que inclouen 5 agents de biocontrol i una soca d'origen clínic cedides pel grup del Dr. B. Duffy (Zürich University of Applied Sciences, Zurich, Suïssa) (annex 2). Les soques es troben conservades en medi LB amb glicerol al 20% a -80°C (Ultra congelador MDFU51865S, Sanyo, Tokio, Japó).

Es va utilitzar la soca PMV6076 (mutant de CFBP1430 *hrp-dsp-*) d'*E. amylovora* cedida per Dr. J.P. Paulin (Institut National de la Recherche Agronomique, Angers, França). Aquesta també es troba conservada a -80°C (Ultra congelador MDFU51865S, Sanyo, Tokio, Japó) en medi LB líquid.

Les soques de *Pantoea* i d'*E. amylovora* es van sembrar en estria en plaques de medi LB (taula 2) i es van incubar a 23 °C (Incubator NU-425-60E, Sanyo, Tokio, Japó) durant 24 hores.

Per als assajos d'activitat inhibidora es van preparar suspensions de cèl·lules d'*E. amylovora* en aigua estèril. Es va recollir una colònia d'un cultiu de 24 h sembrat en medi LB, es va suspendre en aigua estèril i es va ajustar la concentració a 10⁸ UFC/ml. Aquesta es va determinar a partir de l'espectrofotòmetre UV-VIS (Shimadzu UV-150A, Shimadzu Europa GMBH, Japó) ajustant a una absorbància de 0,2 a 600nm que correspon a una concentració de 10⁸ UFC/ml (Puchades, 2017).

4.3 Identificació de soques

4.3.1 Extracció d'ADN

A partir de cultius de les 194 soques de *Pantoea spp.* en medi LB incubats durant 24 h a 23 °C, es va seleccionar una colònia amb un hisop estèril o nansa de sembra estèril i es va dipositar en un tub de centrífuga d'1,5 ml amb 600 µl de medi LB. Després de 24 h d'incubació a 25 °C en agitació a 125 rpm, es va extreure 10 µl del cultiu que es van afegir a un tub amb 90 µl de la solució de tampó de lisi (annex 3). Es va incubar durant 10 min a 99 °C (Keel *et al.*, 1996).

Amb aquest procediment es van obtenir extraccions d'ADN sense purificar entre 70 ng/µl i 100 ng/µl (Puchades, 2017). La concentració i puresa de l'ADN es va mesurar utilitzant l'espectrofotòmetre Nanodrop (ND-1000 Thermo Fisher Scientific, USA) i es va ajustar la concentració a 10 ng/µl diluint amb aigua Milli-Q.

4.3.2 Amplificació mitjançant PCR del gen 16s ARNr

A partir de l'ADN obtingut de cadascuna de les soques es va realitzar una amplificació mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S ARNr. La seqüència i temperatura òptima d'anellament dels encebadors es mostren a la taula 3.

Taula 3 Encebadors de PCR utilitzats per a l'amplificació del gen 16S ARNr (Rezzonico *et al.*, 2009)

Encebadors	Mida (bp)	Tm (°C)	Seqüència (5'-3')
16S-1492R	1503	55	ACGGTTACCTTGTTACGACTT
16S-27F		55	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

L'amplificació per PCR requereix la utilització de diferents reactius; també, encebadors (Sigma-Aldrich Co. LLC), l'enzim *Taq* ADN polimerasa amb estabilitat tèrmica (Biotools B&M Labs S.A., Madrid-Espanya) i dNTP específics (Biotools B&M Labs S.A., Madrid-Espanya) (taula 4).

Es va utilitzar 2 µl de mostra (ADN) i un volum total per reacció de 25 µl.

Taula 4 Mix de PCR per una mostra

Reactiu	Concentració	Volum
Aigua bidestil·lada estèril	-	17,05 µL
Tampó	10x	2,5 µL
Solució MgCl₂	50mM	0,75 µL
dNTP	10 mM	1 µL
Encebador 27 F	10 µM	1 µL
Encebador 1492 R	10 µM	1 µL
Taq	5U/ µL	0,2 µL
ADN	10ng/µL	2 µL

*Els reactius es van obtenir de l'empresa SIGMA-ALDRICH i Biotools B&M Labs S.A

Cada reacció es va realitzar en un microtub que es va introduir en el termociclador (*GeneAmpR PCRsystem 9700 PE, Applied biosystems, EUA*) amb les següents condicions. Es va iniciar amb una fase de desnaturalització, a 94 °C d'una durada de 3 min, seguida de 35 cicles de desnaturalització a 94 °C i 30 segons, un anellament a 52 °C i 45 segons i acabant el cicle amb un allargament a 72 °C i 1 min i 30 segons. Acabant amb un altre allargament a 72 °C i 10 min de durada (Rezzonico *et al.*, 2009) . Tenint una durada aproximada total de dos hores i quaranta minuts.

En cada PCR es va utilitzar un control positiu amb ADN de la soca C9-1 i un control negatiu sense ADN, on es va depositar aigua bidestil·lada estèril. Els productes de l'amplificació es van separar mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa. Es va preparar el gel d'agarosa al 1,2% en tampó TAE 1X i es va introduir en una cubeta d'electroforesi (PowerPac 300,BIO-RAD,EUA) amb tampó TAE 1X, aquest es va posar en funcionament a 90V, generant un camp elèctric amb un temps d'espera aproximadament de 45 min perquè es desplaçés la banda del gen 16S de 1503 bp (Rezzonico *et al.*, 2009). En el procés les molècules es desplacen del pol negatiu al pol positiu i es separen en base a la seva grandària i càrrega. Les molècules més grans tarden més a desplaçar-se que les molècules més petites degut a la mida del porus del gel (Salazar, Sandoval i Armendáriz, 2016).

Amb l'electroforesi finalitzada es va extreure el gel d'agarosa 1,2% del bany de TAE 1X i es va submergir en un bany de Sybr Safe (SYBR® Safe Invitrogen Life Technologies, CA, USA) (elaboració a l'annex 2), en un recipient opac i es va deixar en l'agitador orbital (685/1, Nahita, EUA) entre 15 i 30 min depenent de l'estat del Sybr safe.

Transcorregut el temps les imatges del gel es van capturar amb l'analitzador d'imatges (FX-20M, Vilvert, Lourmat, France) i amb el programa UVipro es va poder observar les bandes fluorescents.

4.3.3 Amplificació mitjançant qPCR

Les soques de *P. agglomerans* de la col·lecció es van identificar utilitzant encebadors específics (*pagR2*) mitjançant amplificació per qPCR. La sonda *pagR2* va ser la utilitzada ja que presenta una especificitat alta. La seqüència i temperatura òptima d'anellament dels encebadors es mostren a la taula 5 (Braun-Kiewnick et al., 2012).

Taula 5 Encebadors de qPCR utilitzats per a l'amplificació de gens 16S ARNr.

Encebadors /Sonda	Tm (°C)	Mida (bp)	Seqüència (5'-3')
<i>PagRrt2_F</i>	60	60	ACG GTG CGT TCC GCA ATA
<i>PagRrt2_R</i>			GGC GCC GGG AAA ACA TAC
<i>sonda pagR2</i>	71		5'-VIC-AAG TTG CGG TCA TTT TAT-3' MGBNFQ

Taula 6 Mix de qPCR necessària per una mostra

	Concentració	Volum
TaqMan MasterMix	2x	10 µL
<i>Pag Rrt2_F</i>	9 µM	2 µL
<i>Pag Rrt2_R</i>	9 µM	2 µL
<i>sonda pagR2</i>	2 µM	2 µL
ADN	10ng/µL	4 µL

* Els reactius es van obtenir de l'empresa SIGMA-ALDRICH i Biotools B&M Labs S.A

Es va partir de 4 microlitres de material genètic i un volum total per reacció de 20 microlitres. Es va tenir en compte la fotosensibilitat de la sonda a l'hora de preparar la mix (taula 6).

La placa de qPCR (SARSTEDT) es va segellar amb el film i es va introduir a la centrifuga (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, EUA) a 1000 rpm, 4 °C i una durada d'1 min.

Es va realitzar la qPCR en un termociclador (7300 Real Time PCR System, Termofisher, EUA) amb les condicions següents: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C , seguit de 45 cicles de 15 segons a 95°C i 1 min a 60°C. Tenint una durada aproximada de 1 hora i 10 minuts.

Les mostres que presentaven amplificació amb uns valors de CT entre 15 i 30 es van considerar *P. agglomerans*. Les mostres que en un primer assaig no presentaven valors de 15-30 es va repetir i si els valors presentats diferien de CT entre 15 i 30 es van considerar negatives (Applied Biosystems, 2006; Stephenson, 2016). Les mesures es va realitzar amb el programa “Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System” i els paràmetres per a la determinació dels resultats, van ser un baseline automàtic amb mínim de 3 i màxim de 15, un threshold manual de 0,2 recomanat per *pagR2* (Braun-Kiewnick et al., 2012).

4.4 Producció de sobrenedants sense cèl·lules de cultius de *Pantoea*

Per a optimitzar les condicions de cultiu de *Pantoea* spp. per a la producció de sobrenedants amb activitat antimicrobiana es van utilitzar dos medis de cultiu GA i MM (taula 1 i a l'annex 1) i diferents temps d'incubació. Es va determinar el nombre de cèl·lules per ml de cultiu al llarg del temps i l'activitat inhibidora enfront *E. amylovora* dels sobrenedants sense cèl·lules.

Es van seleccionar 3 soques de *Pantoea spp* que presenten el gen de producció de pantocina A i elevada activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora*; la soca de referència *P. vagans* C9-1 (Kamber *et al.*, 2012), i les soques de *Pantoea spp*. EPS407 i EPS559 (annex 1).

Es van sembrar les soques de *Pantoea* per estria en medi LB i es van incubar (Incubator NU-425-60E, Sanyo, Japó) a 23 °C durant 24 h.

Passades les primeres 24 h es va realitzar un precultiu, on es va transferir una colònia de cada soca en 20 ml de medi GA o MM líquid en un erlenmeyer de 100 ml, realitzant un cultiu de nit amb agitació (IKA K5501 Digital, IKA LABORTECHNIK, Staufen, Alemanya) a 120 rpm i a 23 °C (Incubator NU-425-60E, Sanyo, Japó). Després de 24 h es van agafar 5 mL de precultiu i es van introduir en 45 ml de GA o MM líquid (respectivament) en un erlenmeyer de 250 ml utilitzant les mateixes condicions d'incubació que el precultiu. A les 24 h es van agafar els cultius de cada soca i es van obtenir el sobrenedants sense cèl·lules (SSC) .

Es van realitzar dos experiments, amb medi GA, per establir la durada òptima d'incubació del cultiu amb màxima activitat antimicrobiana. El primer va ser a 24, 48 i 80 hores i el segon a 50, 55, 60, 64, 69, 71, 123, 128 hores.

Per a l'obtenció del sobrenedant sense cèl·lules (SSC) el cultiu es va centrifugar (5810 R, Eppendorf, EUA) a 12000 rpm, 4 °C durant 10 min, es va separar el pèl·let del sobrenedant. El sobrenedant es va tornar a centrifugar a les mateixes condicions, es va rebutjar el pellet i es va filtrar amb un filtre de 0,45 µm (Millipore).

Es va determinar el nombre de cèl·lules dels cultius realitzats en les diferents condicions mitjançant el mètode de dilucions successives, amb dilucions decimals i sembra en placa.

De cada cultiu (de diferents soques, medis i temps d'incubació) es va mesurar el pH (GLP 21, Crison, Barcelona, Espanya) i l'activitat antimicrobiana del SSC enfront *E. amylovora*.

Per a determinar l'activitat antimicrobiana es van preparar plaques de GA sembrades amb una sobrecapa del mateix medi amb el bacteri indicador. Les sobrecapes es van preparar utilitzant 5 ml de medi GA al 0,7% d'agar i 0,1 ml d'una suspensió d'*E. amylovora* PMV6076 a 10^7 UFC/ml.

Un cop solidificada la sobrecapa es van dipositar gotes de 15 µl de sobrenedant SSC. Es van realitzar tres rèpliques per cada soca, medi i temps d'incubació. Les plaques es van incubar (Incubator NU-425-60E, Sanyo, Japó) a 23 °C durant 24-48 h i es va procedir a mesurar els diàmetres dels halos d'inhibició produïts pel sobrenedant.

4.5 Separació de fraccions de sobrenedant amb activitat inhibidora

Els sobrenedants sense cèl·lules es van fraccionar realitzant una cromatografia d'intercanvi iònic en columna de vidre (Brady *et al.*, 1999), posteriorment es va determinar l'activitat antimicrobiana de cadascuna de les fraccions per seleccionar les fraccions més actives.

Per a la preparació i condicionament es requeria una columna de vidre amb filtre (Afora TM 5832) i una dissolució saturada de NaHCO₃ al 8%. Es van afegir 5 g de resina Dowex 1x8-200 HCO₃⁻ en forma de clorur (sigma-Aldrich) a l'interior de la columna, i es va activar la llera cromatogràfica (resina Dowex), afegint NaHCO₃ al 8% fins a suprimir els clorurs. Per confirmar-ho a les fraccions que s'anaven recollint se'ls afegia una gota de nitrat de plata. Es va determinar que la columna era lliure de clorurs en el moment que es va deixar de produir un precipitat blanc-gris.

Abans de procedir al fraccionament es va confirmar que els SSC tenien un pH de 6-7 per evitar la formació de CO₂ en la columna. Es van introduir 18 ml de SSC sobre la llera cromatogràfica.

Es va iniciar la cromatografia utilitzant com a eluent aigua destil·lada saturada en CO_2 (Jin et al., 2003). Els primers 5 ml es van descartar i es van agafar fraccions de 2 ml fins a recollir un volum total de 125 ml. Les 9 primeres fraccions recollides, es van anomenar del -9 al -1 corresponent a la solució de NaHCO_3 . Les fraccions corresponents a l'extracció es van anomenar del 1 al 53. Es va determinar l'activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora* de les diferents fraccions extretes utilitzant la prova d'activitat inhibidora descrita en l'apartat anterior. (Puchades, 2017)

5. Resultats

5.1 Identificació dels aïllats

En primer lloc es va confirmar la presència d'ADN en les mostres procedents de les extraccions d'ADN de les 194 soques de *Pantoea* spp. utilitzant l'amplificació del gen del 16 S ARNr. Es va confirmar presència de material genètic en 191 soques d'un total de 194. Es va utilitzar com a control positiu la soca C9-1 amb una mida d'amplicó de 1503 pb. Com es mostra a la figura 3 s'observa un gel d'electroforesi on totes les mostres presenten banda de 1503 pb, amb excepció del control negatiu, mostra d'aigua destil·lada.

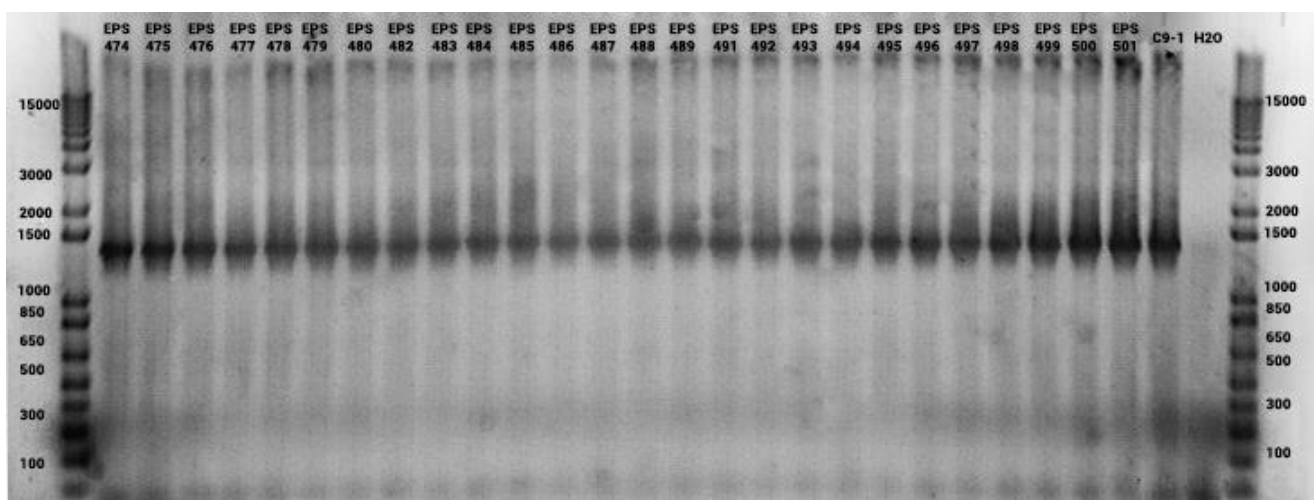


Figura 3 Gel d'electroforesi obtingut de l'amplificació per PCR del gen 16S ARNr amb una mida de 1503 pb. Control positiu *P. vagans* C9-1 (d17).

En la taula 7 s'indiquen els aïllats en els quals es va obtenir una amplificació positiva del gen 16 S ARNr (+) i els que van donar negatiu (-).

Les 191 soques en les que s'havia confirmat l'amplificació del gen 16 S ARNr es van identificar mitjançant qPCR utilitzant encebadors específics de *P. agglomerans*.

Taula 7 Amplificació del gen 16S ARNr

PCR 16S	CODI
—	EPS429, EPS443, EPS509
+	EPS10, EPS13, EPS21, EPS125, EPS130, EPS131, EPS132, EPS156, EPS226, EPS307, EPS311, EPS325, EPS342, EPS388, EPS390, EPS391, EPS392, EPS393, EPS394, EPS395, EPS396, EPS397, EPS399, EPS400, EPS401, EPS403, EPS405, EPS406, EPS407, EPS408, EPS409, EPS411, EPS412, EPS413, EPS414, EPS415, EPS416, EPS417, EPS418, EPS425, EPS426, EPS427, EPS428, EPS430, EPS431, EPS432, EPS433, EPS434, EPS435, EPS436, EPS437, EPS439, EPS440, EPS441, EPS442, EPS444, EPS445, EPS446, EPS447, EPS448, EPS449, EPS450, EPS451, EPS452, EPS453, EPS454, EPS455, EPS456, EPS457, EPS458, EPS459, EPS460, EPS461, EPS466, EPS467, EPS468, EPS469, EPS470, EPS471, EPS472, EPS473, EPS474, EPS475, EPS476, EPS477, EPS478, EPS479, EPS480, EPS481, EPS482, EPS483, EPS484, EPS485, EPS486, EPS487, EPS488, EPS489, EPS490, EPS491, EPS492, EPS493, EPS494, EPS495, EPS496, EPS497, EPS498, EPS499, EPS500, EPS501, EPS502, EPS503, EPS504, EPS505, EPS506, EPS507, EPS508, EPS510, EPS511, EPS512, EPS513, EPS514, EPS515, EPS516, EPS517, EPS518, EPS519, EPS520, EPS522, EPS523, EPS524, EPS525, EPS526, EPS527, EPS528, EPS540, EPS541, EPS542, EPS543, EPS544, EPS545, EPS547, EPS548, EPS549, EPS551, EPS552, EPS553, EPS556, EPS557, EPS559, EPS560, EPS562, EPS563, EPS564, EPS566, EPS567, EPS568, EPS570, EPS572, EPS574, EPS575, EPS576, EPS577, EPS592, EPS593, EPS594, EPS595, EPS596, EPS603, EPS604, EPS605, EPS606, EPS607, EPS608, EPS609, EPS610, EPS611, EPS612, EPS613, EPS614, EPS615, EPS616, EPS617, EPS618, EPS619, EPS620, EPS622, C9-1, Eh318, Eh1087, Eh252, Va21971.

En total 154 soques van donar positiu com a *P. agglomerans*, mentre que 40 van donar negatiu sense poder determinar l'espècie (*Pantoea spp.*). La taula 8 ens mostra els

resultats obtinguts en format resum on indica les soques identificades com a *P. agglomerans* (+) i *Pantoea* spp. (-).

Taula 8 Soques identificades com a *P. agglomerans* (+) i *Pantoea* spp. (-) mitjançant qPCR utilitzant encebadors específics

QPCR	CODI
—	C9-1, EPS553, EPS391, EPS394, EPS396, EPS399, EPS400, EPS401, EPS403, EPS405, EPS408, EPS430, EPS434, EPS437, EPS443, EPS456, EPS461, EPS470, EPS471, EPS477, EPS478, EPS482, EPS486, EPS512, EPS518, EPS524, EPS528, EPS542, EPS544, EPS552, EPS560, EPS566, EPS567, EPS570, EPS575, EPS593, EPS595, EPS603, EPS611, EPS614
<i>P. agglomerans</i>	Eh1087, Eh318, EPS10, EPS125, EPS13, EPS130, EPS131, EPS132, EPS156, EPS21, EPS226, EPS307, EPS311, EPS325, EPS342, EPS388, EPS390, EPS392, EPS393, EPS395, EPS397, EPS406, EPS407, EPS409, EPS411, EPS412, EPS413, EPS414, EPS415, EPS416, EPS417, EPS418, EPS425, EPS426, EPS427, EPS428, EPS429, EPS431, EPS432, EPS433, EPS435, EPS436, EPS439, EPS440, EPS441, EPS442, EPS444, EPS445, EPS446, EPS447, EPS448, EPS449, EPS450, EPS451, EPS452, EPS453, EPS454, EPS455, EPS457, EPS458, EPS459, EPS460, EPS466, EPS467, EPS468, EPS469, EPS472, EPS473, EPS474, EPS475, EPS476, EPS479, EPS480, EPS481, EPS483, EPS484, EPS485, EPS487, EPS488, EPS489, EPS490, EPS491, EPS492, EPS493, EPS494, EPS495, EPS496, EPS497, EPS498, EPS499, EPS500, EPS501, EPS502, EPS503, EPS504, EPS505, EPS506, EPS507, EPS508, EPS509, EPS510, EPS511, EPS513, EPS514, EPS515, EPS516, EPS517, EPS519, EPS520, EPS522, EPS523, EPS525, EPS526, EPS527, EPS540, EPS541, EPS543, EPS545, EPS547, EPS548, EPS549, EPS551, EPS556, EPS557, EPS559, EPS562, EPS563, EPS564, EPS568, EPS572, EPS574, EPS576, EPS577, EPS592, EPS594, EPS596, EPS604, EPS605, EPS606, EPS607, EPS608, EPS609, EPS610, EPS612, EPS613, EPS615, EPS616, EPS617, EPS618, EPS619, EPS620, EPS622, Eh252, Va21971.

5.2 Optimització de la producció de pantocina A

Les soques C9-1, EPS407 i EPS559 que presenten els gens *paap* responsables de la síntesi de pantocina A i també els gens *paal* i *paab* que codifiquen per enzims imprescindibles en la ciclació del pèptid i alhora presenten activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora* van ser seleccionades per l'estudi. Es va estudiar l'efecte del medi de cultiu i del temps d'incubació en l'activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora* dels sobrenedants sense cèl·lules (SSC) obtinguts dels cultius de les soques C9-1, EPS407 i EPS559.

Pel que fa a l'estudi del medi òptim es va realitzar un assaig (taula 9) on es van obtenir cultius de 48 h en medi GA i medi MM per a realitzar les proves d'activitat antimicrobiana. Es va observar que en el medi MM el cultiu presentava valors de pH molt inferiors al medi GA sobretot presentava una baixada de pH en les soques EPS407 i EPS559.

Els SSC obtinguts dels cultius de 48 h en medi GA presentaven activitat antimicrobiana ja que es van observar halos d'inhibició enfront *E. amylovora* en totes les soques. Pel que fa als cultius realitzats en medi MM només els SSC obtinguts a partir de la soca C9-1 inhibien el creixement d'*E. amylovora*.

Taula 9 Activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora* i pH de SSC obtinguts de cultius de 3 soques de *Pantoea* realitzats en diferents medis de cultiu a les 48 h de cultiu.

Soca de <i>Pantoea</i>	Inhibició d' <i>E. amylovora</i>		pH	
	GA	MM	GA	MM
C9-1	+	+	6,8	6,1
EPS407	+	-	6,6	5,9
EPS559	+	-	6,9	5,9

En la figura 4 es mostra l'activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora* dels SSC obtinguts a partir de cultius en medi GA de les tres soques en diferents temps d'incubació. Els SSC de les tres soques presentaven activitat inhibidòria entre 24 i 43 h

amb excepció de la soca EPS559 que no presentava activitat inhibidòria al les 24h. Els valors més alts d'inhibició es van observar en la soca C9-1. Els SSC obtinguts a partir de les 80 h no van presentar activitat antibacteriana en cap de les tres soques.

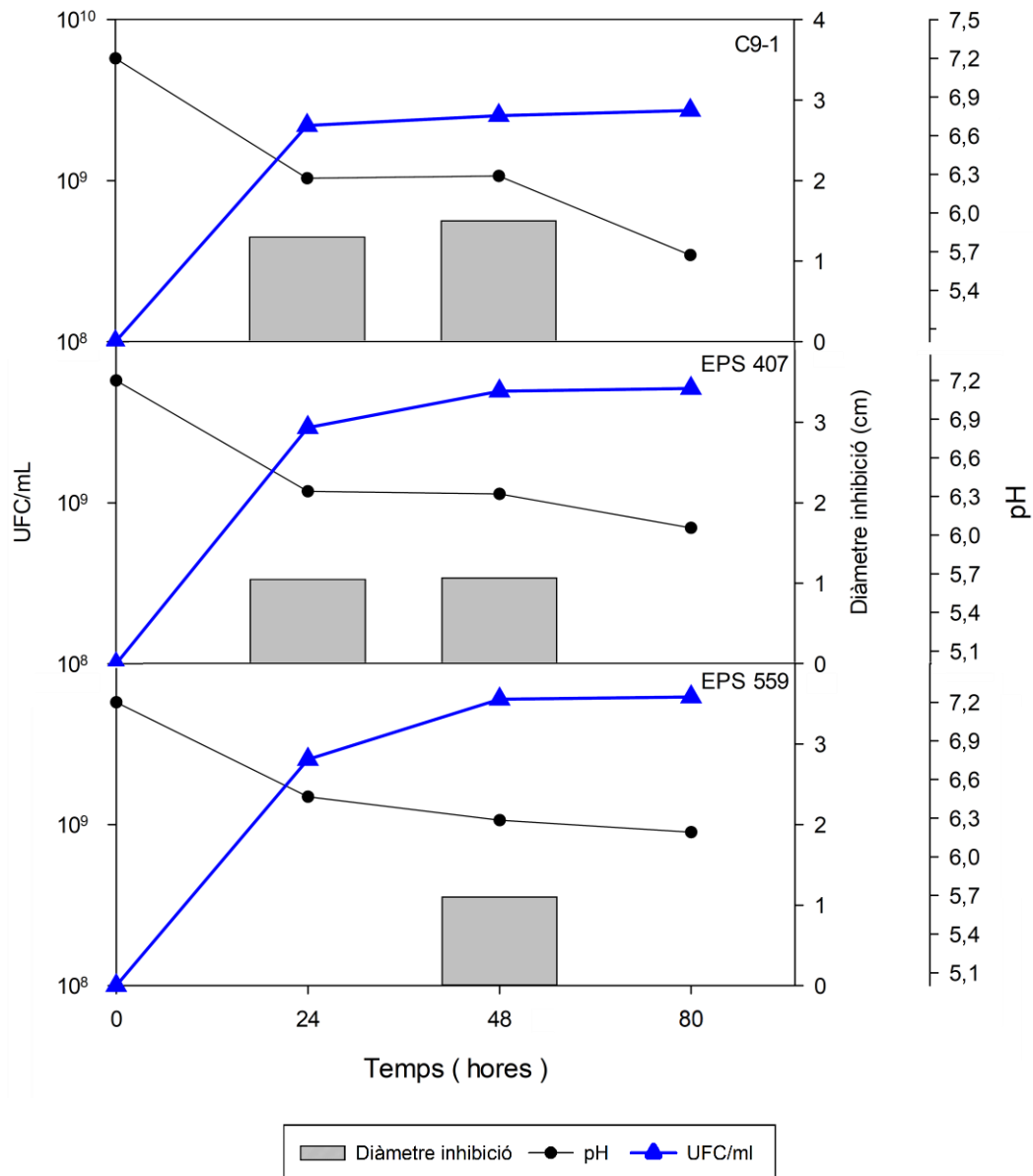


Figura 4 pH, UFC/ml i diàmetre dels halos d'inhibició enfront *Erwinia amylovora* de sobredants de cultius de les soques de *Pantoea spp.* a 24, 43 i 80 hores.

Els SSC obtinguts de la soca C9-1 van presentar una major activitat antimicrobiana que els obtinguts de les altres dues soques, amb un diàmetre d'inhibició de 1,5 cm a les 43 h i de 1,3 cm a les 24 h. Mentre que les altres soques van presentar valors inferiors a 1,1 cm.

Pel que fa al pH podem observar que a les 24 h els cultius de les soques C9-1 i EPS407 presentaven un pH entre 6,2 i 6,3 mentre que de 6,5 en la soca EPS559. A les 43 h de cultiu els SSC presentaven uns valors de pH entre 6,2 i 6,3. Mentre que els SSC obtinguts a 80 h tenien un pH inferior a 6. En aquest assaig no es va observar activitat inhibidora quan el pH dels cultius era inferior a 6,2.

Pel que fa a l'evolució de la població durant el cultiu s'observa que a l'inici del cultiu totes les soques parteixen de 10^8 UFC/mL i creixen exponencialment fins al període estacionari entre les 43 i 80 h. A les 80 h les soques EPS407 i EPS559 presenten valors superiors a $4 \cdot 10^9$ UFC/mL mentre que la soca C9-1 presenta valors inferiors a $3 \cdot 10^9$ UFC/mL.

En la figura 5 es mostra l'activitat antimicrobiana enfront *E. amylovora* dels SSC obtinguts a partir dels cultius en medi GA de les tres soques en diferents temps (50, 55, 60, 64, 69, 71, 123 i 128 h). Els SSC de les soques C9-1 i EPS407 presenten activitat enfront *E. amylovora* entre les 50 i 71 h d'incubació, mentre que en el cas de la soca EPS559 els SSC tenen activitat entre les 60 i 71 h d'incubació.

El valor de màxima inhibició enfront *E. amylovora* el presenten els SSC de la soca C9-1 obtinguts a les 64, 69 i 71 h d'incubació amb uns halos d'inhibició de 1,7 cm. Mentre que els SSC obtinguts de les altres dos soques als mateixos temps d'incubació presenten valors més baixos d'inhibició d'entre 1 cm i 1,2 cm.

Els cultius tenen un pH inicial de 6,7 en les soques EPS407 i EPS559 i un pH 6,6 en la soca C9-1. En tots els casos s'observa que el pH dels cultius disminueix al llarg del temps. A les 71 h d'incubació el pH del SSC és d'aproximadament 6,2 en totes les soques. A les 128 h d'incubació el pH cau fins uns valors inferiors a 5 en el cas de la soca C9-1 i de 6 pel que fa a les soques EPS407 i EPS559. No s'observa activitat antimicrobiana en SSC amb pH inferior a 6,2 en cap de les soques.

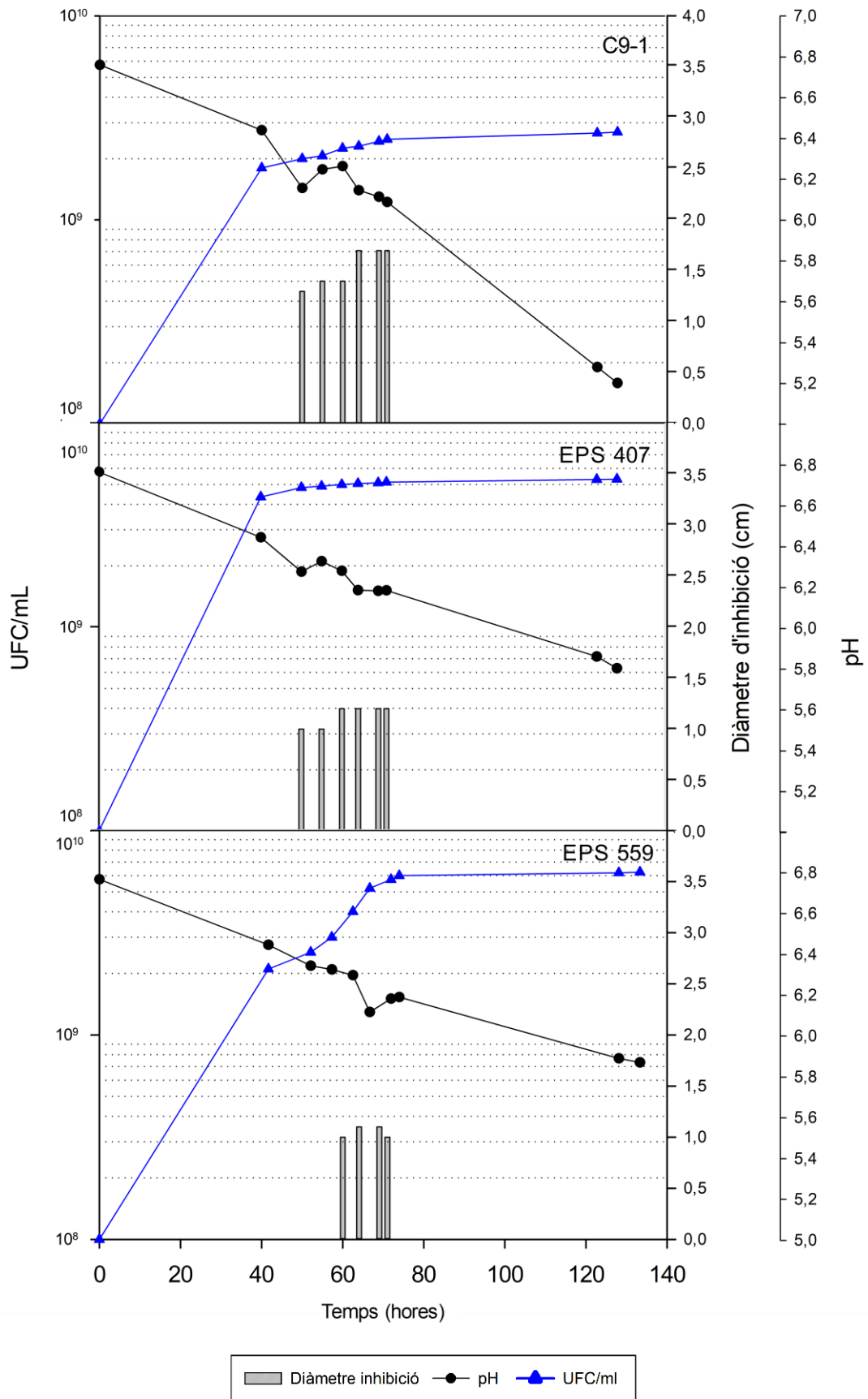


Figura 5 pH , ufc/ml i diàmetre dels halos d'inhibició de *Erwinia amylovora* produïda pels sobrenedants de les soques de *Pantoea spp.*

Pel que fa a l'evolució de la població de les soques de *Pantoea* en els cultius, tots parteixen de 10^8 UFC/mL, creixen exponencialment i assoleixen la fase estacionaria a diferents temps. La primera soca en arribar a la fase estacionaria es la EPS407 que l'asoleix a les 50 h mentre que les soques C9-1 i EPS559 la asoleixen a les 60 i 69 h respectivament. També s'observa que a les 128 h les soques EPS407 i EPS559 presenten valors superiors a $4 \cdot 10^9$ UFC/mL mentre que la soca C9-1 presenta valors inferiors a $3 \cdot 10^9$ UFC/mL.

5.3 Cromatografia

Només una de les fraccions obtingudes en la cromatografia d'intercanvi iònic va presentar activitat inhibidora davant la *E. amylovora*. Es tracta d'una fracció que correspon a compostos retinguts per la columna i eluïts per la fase mòbil. La fracció que va presentar inhibició va ser la número 4 donant lloc a un halos d'inhibició de 1 cm de diàmetre. La resta de les fraccions no van presentar activitat enfront *E. amylovora*.

6. Discussió

Les malalties bacterianes suposen un greu problema pels cultius, ja que provoquen pèrdues econòmiques elevades a nivell mundial degut al deteriorament de les plantes o les seves parts comercials. Es coneixen diversos fitosanitaris que poden prevenir i combatre aquestes malalties però alguns d'aquest compostos presenten certs desavantatges. A més, les noves directives europees (128/2009, Reglament 1107/2009) són molt restrictives respecte els productes fitosanitaris i la seva fitotoxicitat, fent que es vegi reduït el nombre de productes a utilitzar. Per això actualment hi ha un gran interès en desenvolupar nous productes que puguin combatre de manera més eficaç i menys fitotòxica les malalties, com es el cas dels nous bioplaguicides.

Aquest estudi té com a objectiu l'obtenció de pèptids amb activitat antimicrobiana produïts per bacteris del gènere *Pantoea* per a la seva aplicació com a bioplaguicides. En un treball anterior es va partir d'una col·lecció de soques del gènere *Pantoea*, en les que es va determinar la presència de gens responsables de la síntesi de pèptids antimicrobians com pantocina A, pantocina B i dapdiamides (Puchades, 2017). Els resultats d'aquest estudi van mostrar que només 11 soques (EPS21, EPS407, EPS412, EPS481, EPS490, EPS551, EPS552, EPS553, EPS556, EPS557 i EPS559) de les 194 soques de la col·lecció presentaven els gens de síntesi de pantocina A, el que correspon només a un 5,7% del total. Per tal de confirmar que les extraccions d'ADN dels cultiu de *Pantoea* s'havien realitzat correctament i descartar falsos negatius en el present estudi es va realitzar l'amplificació del gen 16S ARNr present en tots els bacteris. Finalment, es va concloure que 191 de les 194 mostres d'ADN s'havien realitzat correctament i per tant es va concloure que en la col·lecció de soques de *Pantoea* obtingudes de hi havia únicament un 5,7 % de presència del gen de síntesi de pantocina A i un 0% de pantocina B i dapdiamides.

A continuació es va determinar si les soques formaven part de l'espècie *P. agglomerans* o d'una altre espècie de *Pantoea*. Amb la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa en temps real (qPCR) es va observar que 154 soques (80% respecte el total) presentaven el gen *pagR2* la qual cosa indicava que formaven part de la espècie *P.*

agglomerans. De les 11 soques que presentaven els gens de pantocina A (gen *paaABC*) 9 soques (82%), es van identificar com a *P. agglomerans*, concretament: EPS21, EPS407, EPS412, EPS481, EPS490, EPS551, EPS556, EPS557 i EPS559. Seria necessari analitzar la seqüència del gen 16S RNAr per tal d'identificar les soques EPS552 i EPS553 que presenten el gen de producció de pantocina A però no es van identificar com a *P. agglomerans*. Cal remarcar que dues de les soques que tampoc es van identificar com a *P. agglomerans* van ser identificades en un estudi anterior com a *Erwinia gerundensis* (Rezzonico et al., 2016).

Es van seleccionar 3 soques que presenten els gens de producció de pantocina A per tal d'optimitzar les condicions de producció de la bacteriocina. L'estudi realitzat anteriorment havia demostrat que les soques presentaven els gens de síntesi de pantocina A i produïen sobrenedants sense cèl·lules (SSC) amb activitat antimicrobiana. L'estudi va permetre establir les condicions òptimes de producció de SSC actius en volums petits (5 ml en tub d'assaig) i en el present treball es pretén obtenir més volum d'SSC mitjançant el cultiu en erlenmeyers. Degut a que la síntesi de compostos antimicrobians depèn en gran mesura de les condicions de cultiu, en el present treball es van establir les condicions òptimes per a l'obtenció de SSC amb activitat inhibidora enfront *E. amylovora*. En altres estudis s'ha observat que el pH del medi influeix en la producció d'antibiòtics (Pusey, Stockwell i Rudell, 2008) depenent de la alcalinitat del medi o la presència d'elements com el percentatge de fosfat poden reduir dràsticament la producció d'antibiotic. L'estudi queda obert a que es determini quins elements presents o absents en el medi potencien o inhibeixen la producció d'antibiotic.

Un cop seleccionades les soques que en estudis anteriors (Puchades, 2017) havien mostrat capacitat de síntesi de bacteriocines, es va comprovar si tenien activitat antibacteriana. Es va confirmar que el seu efecte inhibitori enfront *E. amylovora* no era degut només a l'efecte de les cèl·lules sinó que es va comprovar l'activitat de sobrenedats filtrats sense cèl·lules obtinguts dels cultius. Els SSC obtinguts dels cultius de les tres soques estudiades (C9-1, EPS407 i EPS559) en diferents temps d'incubació van presentar inhibició en algun dels temps avaluats. Es van observar variacions entre les tres soques estudiades. Els cultius de la soca C9-1 presentaven un creixement

moderat, un descens de pH major respecte la soca EPS559 i un assoliment de la fase estacionaria a les 60 h, sent la soca que presentava major diàmetre d'inhibició de l'estudi. Pel que fa a la soca EPS559 durant el mateix període de cultiu presentava un creixement, nombre de UFC/mL, valors de pH superior que la soca C9-1. Amb els resultats obtinguts es podria observar que la producció d'antibiòtic podria estar influenciada per l'arribada a la fase estacionaria i el valor de descens del pH. Altres autor (Pusey, Stockwell i Rudell, 2008) han vist certa influencia del pH, en el nostre estudi s'ha observat que només entre 6 i 7 de pH hi ha producció d'halos d'inhibició. Caldria realitzar un estudi per determinar la influencia del pH respecte la fase estacionaria i la producció d'antibiòtic.

En l'estudi de comparació entre medis de cultiu es van observar diferències entre el medi GA i el medi mínim. Els sobrenedants obtinguts dels cultius en medi mínim només presentaven activitat antimicrobiana en una de les tres soques mentre que els sobrenedants obtinguts en medi GA presentaven activitat en les tres soques factor que s'aproxima amb els resultats d'estudis anteriors pel que fa al medi GA (Puchades, 2017). Els cultius obtinguts en medi mínim van presentar valors de pH molt inferiors que els obtinguts en medi GA. Es va seleccionar el medi GA perquè permetia obtenir sobrenedants sense cèl·lules més actius enfront *E. amylovora* i pH superior.

A més es va determinar que el temps òptim de cultiu de les tres soques per la obtenció de SSC actius es trobava comprès entre 64 h i 71 h que s'aproxima amb els resultats d'estudis anteriors (Pusey, Stockwell i Rudell, 2008). Les condicions òptimes per a la producció de SSC amb activitat antimicrobiana dels cultius realitzats en erlenmeyers van ser de unes 65 h d'incubació mentre que en cultius realitzats en tub d'assaig eren de 72 h (Puchades, 2017). Això pot ser degut a que els erlenmeyers presentaven major aireació, factor que podria ser determinant alhora de la producció de pèptids antimicrobians. Es va observar que els sobrenedant filtrats amb pH inferiors a 6,1 cap presentava inhibició factor que també pot ser determinant alhora de l'eficàcia del pèptid inhibidor.

Per a la purificació del pèptid antimicrobià present en el sobrenedant filtrat, es va utilitzar la tècnica de cromatografia d'intercanvi iònic basat en una metodologia prèviament descrita (Brady et al., 1999). Els resultats es van obtenir en només un assaig i es requeriria d'un altre assaig per a confirmar la informació obtinguda, tot i això es pot obtenir algunes conclusions. La columna cromatogràfica ens va permetre separar les fraccions de sobrenedant que presentaven activitat antimicrobiana de les que no en presentaven. En un estudi preliminar (Puchades, 2017) es van obtenir 3 fraccions actives a partir d'una altre soca de referència Eh318 descrita com a productora de pantocina A. En el nostre estudi es va utilitzar la soca C9-1 i es va trobar activitat antimicrobiana en una de les fraccions. El següent punt d'estudi seria la identificació dels compostos presents en les fraccions actives, per així poder determinar quin es el compost que produeix la inhibició de la *E. amylovora*.

Amb tot l'exposat en aquest treball, es pot determinar que les soques C9-1, EPS407 i EPS559 són soques idònies per a la producció de SSC actius enfront *E. amylovora*. Tot i que totes tres soques presenten els gens responsables de la síntesi de pantocina A manca confirmar la presència de pantocina A en els SSC i demostrar si l'activitat antimicrobiana és deguda a la producció de la bacteriocina.

Seria convenient realitzar estudis sobre la influència de la viscositat en l'activitat inhibidora ja que les soques EPS407 i EPS559 presentaven valors de viscositats alts factors que podrien reduir l'eficàcia d'extracció del pèptid. S'hauria de realitzar estudis utilitzant medis alternatius de cultius com medi LB (Luria Bertani) o medium B.

La cromatografia ens obra un ventall de possibilitats queda pendent la determinació de les fraccions de totes les soques de *P. agglomerans*.

L'estudi queda obert per a l'escalat dels cultius en volums majors, utilitzant bioreactors, com també la modificació de variables que poden avançar en l'optimització de la producció com podria ser l'agitació o la temperatura.

7. Conclusions

Un 80% de les soques de *Pantoea* de la col·lecció PV-CIDSAV s'han identificat com a *P. agglomerans*.

Un total de 9 soques (5,7%) que presenten el gen de la Pantocina A (EPS21, EPS407, EPS12, EPS481, EPS490, EPS551, EPS556, EPS557, EPS559) s'han identificat com a *P. agglomerans*.

La composició del medi, el pH, i la durada del cultiu són factors que afecten en l'activitat antimicrobiana dels sobrenedants sense cèl·lules de *Pantoea* spp. Les condicions òptimes per l'obtenció de sobrenedants actius són cultius en medi GA, entre 6 i 7 de pH i incubats entre 64 i 71 h. La soca C9-1 presenta valors més elevats d'activitat que EPS407 i EPS559.

La tècnica de cromatografia d'intercanvi iònic és adequada per a la separació de fraccions actives de sobrenedants sense cèl·lules obtinguts de cultius de *Pantoea*.

8. Bibliografia

Brady, S. F. et al. (1999). *Pantocin B, an antibiotic from Erwinia herbicola discovered by heterologous expression of cloned genes.* Nova York: Journal of the American Chemical Society.

Braun-Kiewnick, A. et al. (2012). *Development of species-, strain- and antibiotic biosynthesis-specific quantitative PCR assays for Pantoea agglomerans as tools for biocontrol monitoring.* Journal of Microbiological Methods.

Cambra, M. A., Palacio, A., Tomás, L., María, C., i Crespo, J. (2012). *El fuego bacteriano Erwinia amylovora.* Saragossa: Gobierno de Aragón. 4 p.

Carmona, A. (2016) Bacteris de l'àcid làctic com agents de biocontrol de la taca angular de la maduixa. Departament Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària. Universitat de Girona.

Directiva (UE) 2000/29, del 8 de maig, de medidas de protecció contra la introducció en la Comunitat de organismes nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagaci3n en el interior de la Comunitat. Diario Oficial de la Uni3n Europea (2000).

Directiva (UE) 2003/116, de 4 de desembre, por la que se modifican los anexos II, III, IV y V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo en lo que se refiere al organismo nocivo Erwinia amylovora. Diario Oficial de la Uni3n Europea (2003).

Directiva (UE) 2009/128, de 21 de octubre de 2009 , por la que se establece el marco de la actuaci3n comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. Diario Oficial de la Uni3n Europea (2009).

EFSA. (2018). European Food Safety Authority. *Bee health*. [En línia] Accessible a: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bee-health> (Consulta: 28/05/2018).

Generalitat de Catalunya. (2017). Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació. *El foc bacterià*. [En línia] Accessible a: http://agricultura.gencat.cat/ca/ambits/agricultura/dar_sanitat_vegetal_nou/dar_plagues_males_herbes/dar_plagues_bacteris/foc-bacteria/ (Consulta: 29/05/2018).

Hollenhorst, M. A., Clardy, J. i Walsh, C. T. (2009). *The ATP-dependent amide ligases DdaG and DdaF assemble the fumaramoyl-dipeptide scaffold of the dapdiamide antibiòtics*. Biochemistry. ACS Publications.

Jin, M. et al. (2003). *Structural and functional analysis of pantocin A: An antibiotic from Pantoea agglomerans discovered by heterologous expression of cloned genes*. Angewandte Chemie.

Kamber, T. et al. (2012). *Characterization of the biosynthetic operon for the antibacterial peptide herbicolin in Pantoea vagans biocontrol strain C9-1 and incidence in Pantoea species*. Applied and environmental microbiology. American Society for Microbiology.

Keel, C. et al. (1996). *Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent Pseudomonas strains from diverse geographic locations*. Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology.

Ministerio de Agricultura. (2018a). *Superficies y producciones anuales de cultivos*. [En línia] Accessible a: <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/> (Consulta: 29/5/2018).

Ministerio de Agricultura. (2018b) *Fuego Bacteriano (Erwinia amylovora)*. [En línia] Accessible a: <https://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/fuego-bacteriano/> (Consulta: 29/5/2018).

Ministerio de Agricultura. (2018c). *Registro de Productos Fitosanitarios* [En línea] Accessible a: <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/forexi.asp?e=0&plagEfecto=664> (Consulta: 29/5/ 2018).

Mol-Instincts. (2018). *Molecular Weight of Pantocin A and B* [En línea] Accessible a: <https://www.molinstincts.com/molecular-weight/Pantocin-A-mowt-CT1106636784.html>

Moreno, C. (2006). *Characterization and mechanism of action of the biological control agent Pantoea agglomerans EPS125*. Universitat de Girona.

Palacio, A i Cambra, M. A. (2009). *El fuego bacteriano de las rosáceas (Erwinia amylovora)* (2º ed.). Madrid: MAPAMA. 95 p.

Pusey, P., Stockwell, V. i Rudell, D. (2008). *Antibiosis and acidification by Pantoea agglomerans strain E325 may contribute to suppression of Erwinia amylovora*. Phytopathology. American Phytopathological Society.

Puchades, M. (2017). *Obtención de péptidos antimicrobianos producidos por Pantoea spp.* Departament Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària. Universitat de Girona.

Reglament 1107/2009, de 21 de octubre, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea (2009).

Real Decreto 1201/1999, de 9 de juliol, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas. BOE 184 § 16747 (1999).

Real Decreto 58/2005, de 21 de gener, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de

organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros. BOE 19 § 1154 (2005).

Real Decreto 1512/2005, de 22 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 1201/1999, de 9 de julio, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas. BOE 43 § 21533 (2005).

Real Decreto 246/2010, de 5 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 1201/1999, de 9 de julio, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas. BOE 35 § 5103 (2010).

Real Decreto 1786/2011, de 16 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 1201/1999, de 9 de julio, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas. BOE 14 § 720 (2011).

Rezzonico, F. et al. (2009). *Genotypic comparison of Pantoea agglomerans plant and clinical strains*, BMC Microbiology. 204 P.

Rezzonico, F. et al. (2016). *Erwinia gerundensis sp. nov., a cosmopolitan epiphyte originally isolated from pome fruit trees*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 66(3), 1583-1592.

Salazar, A. M., Sandoval, A. S. i Armendáriz, J. S. (2016) Biología molecular fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.

Wright, S. A. et al. (2001). *Pantoea agglomerans strain EH318 produces two antibiotics that inhibit Erwinia amylovorain vitro*. Applied and environmental microbiology. American Society for Microbiology.

Van der Zwet, T., Orolaza-Halbrendt, N. i Zeller, W. (2012). *Fire blight: history, biology, and management*. St. Paul. American Phytopathological Society. 421 p.

Annex 1: Origen de les soques EPS

Codi	Origen	Òrgan	Espècie hospedadora
EPS226	Girona	Arrel	<i>Pyrus communis</i>
EPS307	Setcases	Arrel	<i>Sarotamnus</i>
EPS311	Coll de Merolla	Arrel	<i>Trigonella</i>
EPS325	Fornells	Arrel	<i>Helianthus annuus</i>
EPS342	Lleida	Gemma	<i>Prunus domestica</i>
EPS388	Viader	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Doyenne du Comice</i>)
EPS390	Banyoles	Fulla	<i>Gram'nia</i>
EPS391	Palamós	Flor	<i>Prunus amygdalus</i>
EPS392	Vidal	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>PasseCrassane</i>)
EPS393	Sivina	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>PasseCrassane</i>)
EPS394	Pont de molins	Flor	<i>Prunus avium</i>
EPS395	Banyoles	Fulla	<i>Gram'nia</i>
EPS396	Cadena	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>PasseCrassane</i>)
EPS397	Mas Badia	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>PasseCrassane</i>)
EPS399	Sivina	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>PCrassane</i>)
EPS400	F. Bosch	Gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS401	Ventall	Flor	<i>Prunus amygdalus</i>
EPS403	F. Bosch	Gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS405	Gispert	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS406	Gispert	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS407	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS408	Gispert	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS409	Gispert	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS411	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (<i>Golden</i>)
EPS412	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (<i>Royalgala</i>)
EPS413	Can Calonge	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>G.Leclerc</i>)
EPS414	Can Calonge	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>G.Leclerc</i>)
EPS415	Can Calonge	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>G.Leclerc</i>)
EPS416	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS417	Can Calonge	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>G.Leclerc</i>)
EPS418	Gispert	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS425	Gualta	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (<i>strarking</i>)
EPS426	S. Iscle	Gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS427	Vilabertran	Flor	<i>Prunus armeniaca</i>

EPS428	S Iscle	Gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS429	Casadellà	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (Conference)
EPS430	Casadellà	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (Conference)
EPS431	Vilabertran	Flor	<i>Prunus armeniaca</i>
EPS432	Cabanes	Flor	<i>Prunus spinosa</i>
EPS433	S Iscle	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (bord)
EPS434	Casadellà	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (Conference)
EPS435	S Iscle	Gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS436	Torroella de Fluvià	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS437	S Iscle	Gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS439	Cassà de la Selva	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS440	Gualta	Gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS441	L'armentera	Flor	<i>Prunus avium</i>
EPS442	S Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (top red)
EPS443	L'armentera	Gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS444	S. Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (Golden)
EPS445	S. Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (Golden)
EPS446	Tarragona	Fulla	<i>Corylus avellana</i>
EPS447	L'armentera	Flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS448	Viladamat	Gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS449	S. Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS450	L'armentera	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS451	Vilamacolum	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS452	Viladamat	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS453	Viladamat	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS454	Vilamacolum	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS455	L'armentera	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS456	S. Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (Starking)
EPS457	S. Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (Starking)
EPS458	S. Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (Starking)
EPS459	S. Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS460	Viladamat	Gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS461	L'armentera	Flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS466	Santa Coloma de Farners	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (Grand Champion)
EPS467	Gispert	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (Conference)
EPS468	St Iscle	Gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS469	St Iscle	Gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS470	Casadellà	Flor	<i>Pyrus communis</i>

EPS471	Casadellà	Flor	<i>Pyrus communis</i>
EPS472	Tarragona	Gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS473	Tarragona	Gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS474	Casademont	Gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS475	Sivina	Gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS476	Sivina	Gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS477	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus malus (Royalgala)</i>
EPS478	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus malus (Royalgala)</i>
EPS479	Gualta	Gemma	<i>Pyrus malus (Starking)</i>
EPS480	Vilamacolum	Flor	<i>Prunus persica (BabyGold)</i>
EPS481	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus malus (Royalgala)</i>
EPS482	Roman	Gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS483	Gispert	Gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS484	Gualta	Gemma	<i>Pyrus malus (Strarking)</i>
EPS485	Gualta	Gemma	<i>Pyrus malus (Strarking)</i>
EPS486	S Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus malus (Top red)</i>
EPS487	Vilamacolum	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS488	S Pere Pescador	Gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS489	S Iscle	Gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS490	L'armentera	Gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS491	Vilamacolum	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS492	S Coloma de Farners	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS493	S Coloma de Farners	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS494	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus malus (Golden)</i>
EPS495	Viladamat	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS496	Viladamat	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS497	Tarragona	Gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS498	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS499	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus malus (Golden)</i>
EPS500	Tarragona	Gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS501	Gualta	Gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS502	Casadellà	Gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS503	Gualta	Gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS504	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS505	Cadena	Gemma	<i>Pyrus communis (PasseCrassane)</i>
EPS506	Cadena	Gemma	<i>Pyrus communis (PasseCrassane)</i>
EPS507	Viladamat	Flor	<i>Prunus avium</i>
EPS508	Viladamat	Flor	<i>Prunus avium</i>

EPS509	Can Calonge	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (General Leclerc)
EPS510	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (Comice)
EPS511	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (Comice)
EPS512	Mas Badia	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (G.Wellspur)
EPS513	Mas Badia	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (G.Wellspur)
EPS514	Sivina	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (PasseCrassane/ Alexandrine)
EPS515	Sivina	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (PasseCrassane/ Alexandrine)
EPS516	Sivina	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (PasseCrassane/ Alexandrine)
EPS517	Vidal	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (PasseCrassane)
EPS518	Vidal	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (PasseCrassane)
EPS519	Vidal	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (PasseCrassane)
EPS520	Cassà de la Selva	Gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS521	S Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS522	S Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS523	Gispert	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (Golden)
EPS524	Tarragona (El Catllar)	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS525	Tarragona (El Catllar)	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS526	S Pere Pescador	Gemma	<i>Pyrus malus</i> (Starking)
EPS527	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (PasseCrassane)
EPS528	Mas Oller	Gemma	<i>Pyrus communis</i> (PasseCrassane)
EPS540	Calonge	Gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS541	Calonge	Gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS542	Calonge	Flor	<i>Pyrus communis</i>
EPS543	Calonge	Flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS544	Calonge	Flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS545	Calonge	Flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS546	S Antoni de Calonge	Fulla	<i>Pyrus communis</i>
EPS547	S Antoni de Calonge	Flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS548	Can Calonge	Fulla	<i>Cotoneaster</i>
EPS549	Sant Antoni de Calonge	Fulla	<i>Prunus persica</i>
EPS551	Sant Joan de Palamós	Fulla	<i>Prunus amygdalus</i>
EPS552	Sant Joan de Palamós	Fulla	<i>Prunus amygdalus</i>
EPS553	Calonge	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS554	Calonge	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS556	Calonge	Fulla	<i>Pyrus communis</i>
EPS557	Calonge	Fulla	<i>Pyrus communis</i>
EPS559	Calonge	Flor	<i>Prunus persica</i>
EPS560	Mas Oller	Fulla	<i>Crataegus</i>

EPS562	Mas Oller	Fulla	<i>Pyrus communis</i> PasseCrassane
EPS563	Mas Oller	Fulla	<i>Crataegus</i>
EPS564	Mas Oller	Flor	<i>Pyrus communis</i> Conference
EPS566	Mas Oller	Fulla	<i>Crataegus</i>
EPS567	Can Calonge	Fulla	<i>Pyrus communis</i> General Leclerc
EPS568	Mas Oller	Flor	<i>Pyrus communis</i> PasseCrassane
EPS569	Mas Oller	Flor	<i>Pyrus communis</i> Conference
EPS570	Can Calonge	Flor	<i>Pyrus communis</i> General Leclerc
EPS572	Mas Oller	Flor	<i>Crataegus</i>
EPS573	Mas Oller	Flor	<i>Pyrus malus</i> (Golden)
EPS574	Mas Oller	Flor	<i>Crataegus</i>
EPS575	Can Calonge	Flor	<i>Pyrus communis</i> General Leclerc
EPS576	Mas Oller	Fulla	<i>Pyrus communis</i> General Leclerc
EPS577	Can Calonge	Flor	<i>Pyrus communis</i> General Leclerc
EPS592	Mas Badia	Fulla	<i>Winter Nellis</i>
EPS593	Mas Badia	Fulla	<i>Pyrus communis</i> General Leclerc
EPS594	Mas Badia	Flor	<i>Pyrus malus</i>
EPS595	Mas Badia	Fulla	<i>Pyrus communis</i> (Winter Nellis)
EPS596	Mas Badia	Fulla	<i>Pyrus malus</i>
EPS603	Mas Badia	Fulla	<i>Pyrus communis</i> (General Leclerc)
EPS604	Mas Badia	Flor	<i>Pyrus malus</i>
EPS605	Santa Cristina	Fulla	<i>Pyrus malus</i> (Goldenestandar)
EPS606	Llagostera	Fulla	<i>Crataegus</i>
EPS607	Mas Badia	Fulla	<i>Pyrus communis</i> (RogeRed)
EPS608	Llagostera	Fulla	<i>Crataegus</i>
EPS609	Mas Badia	Fulla	<i>Pyrus malus</i>
EPS610	Santa Cristina	Flor	<i>Pyrus malus</i> (Goldenestandar)
EPS611	Llagostera	Flor	<i>Crataegus</i>
EPS612	Llagostera	Flor	<i>Crataegus</i>
EPS613	Mas Badia	Fulla	<i>Prunus persica</i>
EPS614	Llagostera	Flor	<i>Crataegus</i>
EPS615	Llagostera	Flor	<i>Crataegus</i>
EPS616	Mas Badia	Fulla	<i>Pyrus communis</i> (RogeRed)
EPS617	Mas Badia	Fulla	<i>Pyrus communis</i> (RogeRed)
EPS618	Llagostera	Fulla	<i>Crataegus</i>
EPS619	Santa Cristina	Fulla	<i>Pyrus malus</i> (Goldenestandar)
EPS620	Llagostera	Fulla	<i>Crataegus</i>
EPS621	Mas Badia	Fulla	<i>Pyrus communis</i> (Rogered)

EPS622	Santa Cristina	Fulla	<i>Pyrus malus (Goldenestandar)</i>
EPS10	Mas Oller (Cassà de la Selva)	Fulla	<i>Pyrus communis(PasseCrassane)</i>
EPS13	Mas Oller (Cassà de la Selva)	Fulla	<i>Pyrus communis(PasseCrassane)</i>
EPS21	Mas Oller (Cassà de la Selva)	Fruit	<i>Pyruscommunis(General Leclerc)</i>
EPS125	Mas Oller (Cassà de la Selva)	Fruit	<i>Pyruscommunis(Comice)</i>
EPS130	Mas Oller (Cassà de la Selva)	Fruit	<i>Pyruscommunis(Comice)</i>
EPS131	Mas Oller (Cassà de la Selva)	Fruit	<i>Pyruscommunis(Comice)</i>
EPS132	Mas Oller (Cassà de la Selva)	Fruit	<i>Pyruscommunis(Comice)</i>
EPS156	Mas Oller (Cassà de la Selva)	Fulla	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS202	Mas Oller (Cassà de la Selva)	Fruit	<i>Pyruscommunis(Conference)</i>
EPS210	Mas Oller (Cassà de la Selva)	Fruit	<i>Pyruscommunis(Conference)</i>
EPS230	Girona Fruits	Fruit	<i>Pyrus malus(GoldenSmothee)</i>
EPS237	Girona Fruits	Fruit	<i>Pyruscommunis(Ercolini)</i>
EPS273	El Redós (Pals)	Fulla	<i>Vitis vinifera</i>
EPS283	El Redós (Pals)	Fulla	<i>Prunus avium</i>

Annex 2: Soques de referència

Codi	Origen	Òrgan	Espècie hospedadora	Característiques
<i>c9-1</i>	USA	Fruit	<i>Malus X domestica</i>	Agent de biocontrol / <i>P. vagans</i>
<i>Eh318</i>	USA	Tija	<i>Malus X domestica</i>	Agent de biocontrol / <i>P. agglomerans</i>
<i>EPS125</i>	Espanya	Fruit	<i>Pyrus communis</i>	Agent de biocontrol / <i>P. agglomerans</i>
<i>Eh1087</i>	Nova Zelanda	Flor	<i>Malus X domestica</i>	Agent de biocontrol / <i>P. agglomerans</i>
<i>Eh252</i>	USA	-	<i>Malus pumilla</i>	Agent de biocontrol / <i>Pantoea spp.</i>
<i>Va21971</i>	Espanya	Ferida	<i>Humana</i>	Aïllat clínic/ <i>P. agglomerans</i>

(Kamber *et al.*, 2012).

Annex 3: Reactius i medis complementaris

Medi	Composició
Marcador de pes molecular	10 µL 1kb plus ladder invitrogen 40 µL Tampó de càrrega (5x) 150 µL Aigua destil·lada
Tampó de càrrega	3 mL Glicerol 7 mL Aigua destil·lada 0,025g blau bromofenol 0,025g Xilencianol
dNTP	100 µL ATP 100 µL TTP 100 µL GTP 100 µL CTP 600 µL H ₂ O
SYBER	10 µL Syber invitrogen 100 mL TAE1X
Gel Agarosa 1,5%	1,2 g Agarosa 80 mL TAE1X