

Treball final de grau

Estudi: Grau en Innovació i Seguretat Alimentària

Títol:

Classificació d'aïllats del complex *Pseudomonas fluorescens* en grups filogenètics mitjançant marcadors específics per a la selecció d'agents de biocontrol

Document: Memòria del Treball Final de Grau

Alumna: Saskia Trauschke Amigó

Tutores: Anna Bonaterra i Esther Badosa

Departament: EQATA

Àrea: Producció Vegetal

Convocatòria (mes/any) Juliol/2019

ÍNDEX

RESUM.....	1
PARAULES CLAU	3
AGRAÏMENTS.....	4
1. INTRODUCCIÓ.....	5
1.1. El futur pròxim de la població i la demanda d'aliments	5
1.2. Estratègies per augmentar la producció: plaguicides i problemàtica	5
1.3. Alternatives als productes químics de síntesi: agents de biocontrol	6
1.4. El complex <i>Pseudomonas fluorescens</i> i les seves característiques com a ACB	8
1.5. <i>P. fluorescens</i> productores de metabòlits insecticides: toxina fit i HCN	10
1.6. Antecedents	11
1.7. Objectius	12
2. MATERIAL I MÈTODES	13
2.1. Medis de cultius, tampons i reactius	14
2.2. Soques bacterianes, selecció i extracció d'ADN	15
2.3. Disseny d'encebadors del gen de la toxina insecticida fit	15
2.4. Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	16
2.4.1. Encebadors	16
2.4.2. PCR.....	18
2.4.3. Lectura dels resultats de la PCR: Electroforesis	20
2.5. Seqüenciació de fragments d'amplificació	21
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	22
3.1. Soques bacterianes i extracció d'ADN	22
3.2. Assignació dels aïllats de <i>P. fluorescens</i> als filogrups d'interès.....	23
3.3. Presència de gens de producció d'àcid cianhídric	25
3.4. Presència de gens de producció de la toxina fit	28
3.5. Discussió general.....	33
4. CONCLUSIONS.....	35
5. BIBLIOGRAFIA	36
6. ANNEX.....	42

RESUM

En un món en que la població experimenta un creixement continu, existeix la necessitat d'incrementar la producció agrícola i desenvolupar nous sistemes de maneig de malalties i plagues sostenibles compatibles amb el medi ambient. Per així, assegurar la seguretat alimentària i optimitzar la protecció de cultius.

El conjunt d'efectes adversos associats als plaguicides químics de síntesi i l'exigència dels consumidors per obtenir aliments sense residus ha conduït a la cerca d'eines de maneig alternatives com els agents de control biològic (ACB). Aquests són microorganismes que disminueixen les malalties associades a fitopatògens i plagues dels cultius mitjançant diversos mecanismes. Concretament, la competència pels nutrients o l'espai, l'antagonisme a través de la producció de metabòlits, el parasitisme i la inducció de defenses en plantes.

Els bacteris del complex *Pseudomonas fluorescens* són bons candidats per a ser utilitzats com a ACB i com a Bacteris Promotors del Creixement de Plantes (BPCP). Aquests bacteris produeixen una gran quantitat de metabòlits amb activitat antifúngica, antimicrobiana i insecticida. El complex, està format per 8 filogrupos *P. corrugata*, *P. koreensis*, *P. jessenii*, *P. mandelii*, *P. gessardii*, *P. fluorescens*, *P. protegens*, i *P. chlororaphis*. La majoria de propietats relacionades amb l'activitat de control biològic estan distribuïdes filogenèticament entre els principals grups d'aquest complex. Recentment s'han descrit 9 marcadors moleculars específics que permeten l'assignació ràpida d'aïllats del complex *P. fluorescens* a aquests filogrupos.

Algunes soques del complex *P. fluorescens* poden parasitar insectes i produir metabòlits insecticides com l'àcid cianhídric o la toxina fit. L'àcid cianhídric confereix als microorganismes que el produeixen certs avantatges competitius en el medi, ja que és un compost altament tòxic. Els filogrupos de *P. fluorescens* que sintetitzen HCN són *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. koreensis*, *P. corrugata* i *P. mandelii* s'han descrit diversos marcadors moleculars de gens relacionats amb la producció d'àcid cianhídric com el HCN1 i HCN2. La toxina fit (*P. fluorescens insecticidal toxin*) ha estat recentment descrita en soques de *P. chlororaphis* i *P. protegens* i presenta activitat envers diversos insectes. La síntesi de fit està codificada per un clúster de 8 gens, que inclou el gen *fitD* que codifica per la toxina insecticida i que està flanquejat pels gens *fitA*, *fitB*, *fitC*, *fitE* que codifiquen per proteïnes de secreció i els gens *fitF*, *fitG*, *fitH* que codifiquen per proteïnes reguladores.

Els objectius del present treball van consistir en: (1) assignar les soques del complex *P. fluorescens* de la col·lecció del Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal (CIDSAV) als filogrupos amb potencial com a insecticides *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P.*

protegens, i (2) detectar la presència de gens relacionats amb la producció de metabòlits insecticides en soques de *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens*.

Pel que fa a l'assignació de soques als filogrupos d'interès, es van utilitzar els marcadors moleculars DGPf_4, DGPf_7 i DGPf_8, i es van identificar un total de 101 (39.7% del total de soques de la col·lecció del CIDSAV) soques de *P. fluorescens* i 4 (1,5% del total de soques de la col·lecció del CIDSAV) de *P. chlororaphis*. No es va detectar cap soca de *P. protegens*. De les soques identificades com a *P. fluorescens* 9 van presentar el gen de producció d'àcid cianhídric. Posteriorment, es van dissenyar dos parells d'encebadors (CL per *P. chlororaphis* i *Pseudomonas* sp., i Pr per *P. protegens*) per detectar la presència dels gens de producció de la toxina fit. No es va detectar la presència del gen *fitD* en cap soca de la col·lecció del CIDSAV.

PARAULES CLAU

Complex *Pseudomonas fluorescens*, Filogrups, Biocontrol, Activitat insecticida, Àcid cianhídric, Toxina fit

AGRAÏMENTS

M'agradaria dedicar un moment en expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que m'han ajudat i m'han fet costat al llarg del meu treball, que en tot moment han estat sempre presents per donar-me suport i que sense elles aquest treball no hagués sigut possible.

Especialment, vull agrair a les meves tutores, a la Dra. Esther Badosa i Dra. Anna Bonaterra per donar-me l'oportunitat de dur a terme aquest projecte tant meravellós i educatiu. Gràcies per tot l'esforç que m'heu dedicat i els coneixements que m'heu aportat. Sobretot per endinsar-me en un camp que fins ara era desconegut per mi i que, alhora, això no suposés cap inconvenient per dur a terme aquest treball. Moltes gràcies per la vostra ajuda, paciència, confiança, disponibilitat i alegria.

Agrair també a tot l'equip del Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal, per oferir-me un lloc de treball on m'he sentit com a casa. Gràcies per la vostra ajuda i tots els moments que hem compartit junts.

Finalment, als meus amics, parella i família, els qui creuen més en mi. Gràcies per donar-me suport constantment per superar-me a mi mateixa i assolir els meus objectius.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. El futur pròxim de la població i la demanda d'aliments

El món actual es troba en un constant creixement de la població (Gatehouse, Ferry, Edwards, & Bell, 2011). La població mundial de l'any 2017 era de 7.600 milions i es preveu que aquesta xifra augmenti 1.000 milions en 15 anys, fins a arribar a una població total de 11.200 milions l'any 2100 (United Nations, 2017).

En conseqüència, la demanda d'aliments es veurà incrementada, afectant a l'accés i a la disponibilitat d'aquests. En concret, caldrà augmentar la producció alimentària a nivell global un 70% abans de l'any 2050 per abastir a la població (Ingram, 2011; Keinan & Clark, 2012). Així doncs, serà necessari adoptar mesures i trobar noves estratègies, augmentant la producció i, alhora, assegurant la seguretat alimentària (Syed Ab Rahman, Singh, Pieterse, & Schenk, 2018).

1.2. Estratègies per augmentar la producció: plaguicides i problemàtica

Els augments de producció necessaris per a satisfer la creixent demanda d'aliments s'hauran d'aconseguir principalment utilitzant estratègies que permetin la millora en la productivitat agrícola i l'eficiència en l'ús de recursos. La productivitat agrícola es veu reduïda en gran mesura per la presència de plagues i patògens que causen malalties a les plantes provocant una disminució del 30-40% del rendiment anual de les collites globals (Oerke, 2006). Els insectes, degut a la seva gran diversitat i adaptabilitat, són els que causen majors danys a la salut i a la productivitat dels cultius agrícoles, sobretot els que afecten el sistema radicular, els quals són difícils de controlar amb mètodes convencionals (Péchy-Tarr et al., 2013).

Així doncs, una estratègia per assolir una major productivitat dels cultius és augmentar el rendiment, millorant els sistemes de maneig de plagues i malalties. Els plaguicides (insecticides, fungicides, herbicides...), són compostos que s'utilitzen principalment per protegir les plantes de plagues, males herbes i malalties. Tradicionalment, els plaguicides més utilitzats i eficaços han consistit en productes químics de síntesi que han permès reduir notablement el desenvolupament de plagues, malalties i males herbes (Nicolopoulou-Stamati, Maipas, Kotampasi, Stamatis, & Hens, 2016). En conseqüència, degut a la inexistència d'alternatives eficaces els productors van passar a dependre cada vegada més dels agroquímics. En els darrers anys s'han associat als plaguicides químics de síntesi un elevat nombre d'efectes nocius tant per la salut pública com pel medi ambient, així com el desenvolupament de resistències de patògens (Compant, Duffy, Nowak, Clément, & Barka, 2005). Molts estudis confirmen que en el cos humà els plaguicides químics poden ser metabolitzats, excretats, emmagatzemats o bioacumulats en el greix corporal, provocant diversos efectes negatius associats a malalties dermatològiques, gastrointestinals,

cancerígenes, neurològiques, respiratòries, endocrines i reproductives (Hayes et al., 2006; Mnif et al., 2011; Mostafalou & Abdollahi, 2013). A més, es poden trobar residus d'aquestes substàncies en els aliments, ja que el rentat i pelat no aconsegueix eliminar-los completament (Reiler et al., 2015; Witczak & Abdel-Gawad, 2014). En la majoria dels casos, els nivells de concentració de residus no arriben a superar els límits màxims de residus establerts en la legislació (Nougadère et al., 2012). No obstant, aquests límits segurs podrien arribar a subestimar el risc real per a la salut degut a l'exposició simultània a dues o més substàncies químiques i efectes sinèrgics (Kortenkamp, 2007). És per tots aquests motius, que en la Unió Europea s'han introduït canvis legislatius (Directiva 2009/128/EC i Reglament 1107/2009) que imposen els principis per a la implementació d'un sistema de maneig integrat en el sector agrícola. En aquest sistema s'impedeix l'ús dels productes químics més nocius per als animals i els humans i persistents en el medi amb la seva retirada del mercat (Alewu B. & Nosiri C., 2011).

1.3. Alternatives als productes químics de síntesi: agents de biocontrol

El conjunt d'efectes adversos dels productes químics de síntesi i l'exigència dels consumidors per obtenir aliments sense plaguicides ha propiciat la recerca de productes substitutius com l'ús d'organismes antagonics coneguts com a agents de control biològic (ACB) (Compant et al., 2005; Flury et al., 2018). Aquests són organismes que s'introdueixen artificialment al medi i que tenen la capacitat de controlar les malalties, plagues, o, si més no, reduir-ne la seva quantitat/efecte gràcies a diversos mecanismes (Campbell, 1989). Concretament, el control biològic es basa en diverses interaccions que inclouen: la competència pels nutrients o l'espai, l'antagonisme a través de la producció de compostos antimicrobians o d'enzims lítics, el parasitisme d'alguns microorganismes envers els patògens o plagues i la inducció de defenses en plantes envers el patògen. A més, alguns estudis descriuen que el biocontrol es pot utilitzar en situacions en que els plaguicides químics de síntesi no poden ser utilitzats a causa de problemes de residus o bé quan el producte ha de ser certificat en producció ecològica (Fravel, 2005).

Així doncs, el control biològic esdevé una molt bona estratègia per incrementar la producció alimentària (Péchy-Tarr et al., 2008). Actualment, a la Unió Europea hi ha 46 agents de control biològic aprovats com a ingredients actius de bioplaguicides pel control de malalties i plagues de les plantes. A la Taula 1.1 s'observa que hi ha disponibles 18 bacteris, 24 fongs i 4 llevats com a agents de biocontrol.

Taula 1.1. Agents de control biològic aprovats a la Unió Europea (Juny 2019).

INGREDIENT ACTIU	CATEGORIA*
BACTERIS	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST 713	BA, FU
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AH2*	FU
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT-45**	FU
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBI 600	FU
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB24	FU
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> D747	FU
<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	FU
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST 713	BA, FU
<i>Bacillus subtilis</i> IAB/BS03**	FU
<i>Bacillus sphaericus</i>	IN
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Aizawai</i> ABTS-1857 i GC-91	IN
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Israeliensis</i> AM65-52	IN
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> ABTS 351, PB 54, SA 11, SA12 i EG 2348	IN
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Tenebrionis</i> NB 176 (TM 14 1)	IN
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	FU
<i>Pseudomonas</i> sp. DSMZ 13134	FU
<i>Streptomyces</i> K61 (formalment <i>S. griseoviridis</i>)	FU
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC 108	FU, BA
FONGS	
<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ10	FU
<i>Beauveria bassiana</i> 203**	IN
<i>Beauveria bassiana</i> IMI389521	IN
<i>Beauveria bassiana</i> PPRI 5339	IN
<i>Beauveria bassiana</i> 147	IN
<i>Beauveria bassiana</i> NPP111B005	IN
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 74040 i GHA	IN
<i>Clonostachys rosea</i> J1446	FU
<i>Coniothyrium minitans</i> CON/M/91-08 (DSM 9660)	FU
<i>Isaria fumosorosea</i> Apopka 97 (formalment <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>)	IN
<i>Lecanicillium muscarium</i> (formalment <i>Verticillium lecanii</i>) Ve6	IN
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> BIPESCO 5/F52	IN
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> Fe9901	IN
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	FU
<i>Trichoderma asperellum</i> (formalment <i>T. harzianum</i>) ICC012, T25 i TV1	FU
<i>Trichoderma asperellum</i> T34	FU
<i>Trichoderma atroviride</i> (formalment <i>T. harzianum</i>) IMI 206040 i T11	FU
<i>Trichoderma atroviride</i> AGR2**	FU
<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237	FU
<i>Trichoderma atroviride</i> SC1	FU
<i>Trichoderma gamsii</i> (formalment <i>T. viride</i>) ICC080	FU
<i>Trichoderma harzianum</i> T-22 i ITEM 908	FU
<i>Verticillium albo-atrum</i> (formalment <i>Verticillium dahliae</i>) WCS850	FU
<i>Fusarium</i> sp. L13	FU
LLEVATS	
<i>Aureobasidium pullulans</i> DSM 14940 i DSM 14941	FU,BA
<i>Candida oleophila</i> O	FU
<i>Metschnikowia fructicola</i>	FU
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LAS02	FU

*Categoria: FU, fungicida; BA, bactericida i IN insecticida.

** Pendants d'aprovar

1.4. El complex *Pseudomonas fluorescens* i les seves característiques com a ACB

El gènere *Pseudomonas* és un dels gèneres de bacteris gram-negatius més diversos i complexos que hi ha actualment. Al llarg dels anys, la taxonomia d'aquest gènere ha sofert molts canvis. El número d'espècies de *Pseudomonas* ha augmentat en els darrers anys (Gomila, Peña, Mulet, Lalucat, & García-Valdés, 2015), arribant a un total de més de 250 espècies reconegudes (<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>). En el complex/espècie *Pseudomonas fluorescens* s'han descrit diversos grups (Peix, Ramírez-Bahena, & Velázquez, 2018) que tradicionalment, s'havien classificat en biovars segons les característiques fenotípiques (Stanier, Palleroni, & Doudoroff, 1966). Avui dia, l'Anàlisi de Seqüència MultiLocus (MLSA) és el mètode preferit per establir les relacions filogenètiques entre gèneres i espècies. Utilitzant aquest mètode amb les seqüències parcials de quatre gens de manteniment, *16S rRNA*, *gyrB*, *rpoB*, and *rpoD* es pot classificar el complex *P. fluorescens* en diversos grups (Garrido-Sanz et al., 2016; Gomila et al., 2015; Mulet, Lalucat, & García-Valdés, 2010). Aquesta anàlisi basada en MLSA ha mostrat una bona concordança amb el mètode descrit per Garrido-Sanz et al., (2017) que classifica els bacteris del complex *P. fluorescens* en vuit filogrupos: *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. chlororaphis* i *P. protegens*. Aquest estudi descriu 9 marcadors moleculars que permeten la classificació ràpida de qualsevol aïllat de *P. fluorescens* en 8 filogrupos mitjançant una prova de presència/absència d'aquests marcadors mitjançant l'amplificació de l'ADN utilitzant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

Els membres del complex *P. fluorescens* han estat aïllats de diversos habitats com animals (Vela et al., 2006), teixits vegetals (Brown et al., 2012), aigua (Miranda & Zemelman, 2002), sòl (Andersen, Johnsen, Sørensen, Nielsen, & Jacobsen, 2000), fongs (Rainey, Brodey, & Johnstone, 1993) i humans (Scales, Erb-Downward, LiPuma, & Huffnagle, 2015). A més, poden colonitzar ambients molt diversos i utilitzar molts exsudats presents en els sòls i plantes com a font de nutrients (Höfte & Altier, 2010). Molts d'aquests bacteris tenen gran interès biotecnològic, en concret, en l'àmbit de la producció agrària es poden utilitzar com a promotors del creixement de les plantes, en bioremediació de sòls i com a agents de control biològic (Vacheron et al., 2019). Atès que influeixen en l'equilibri hormonal de les plantes (Kang et al., 2006), degraden certs compostos contaminants com metalls pesants i pesticides (Wasi, Tabrez, & Ahmad, 2013) i minimitzen els efectes dels fitopatògens (Raaijmakers & Weller, 2001). Aquests trets importants, es troben distribuïts filogenèticament entre els grups principals del complex (Garrido-Sanz et al., 2016). A la Taula 1.2 es mostren diverses característiques tecnològiques segons els filogrupos. Particularment, les soques de les espècies *P. corrugata*, *P. chlororaphis* i *P. protegens* produeixen una sèrie de metabòlits amb propietats antifúngiques com 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), resorcinol, fenazines i altres antibiòtics com pirrolnitrina, i pioluteorina (Raaijmakers & Weller, 2001; Ramette et al., 2011). D'altra banda, les soques que pertanyen als filogrupos *P. chlororaphis* i *P. koreensis* presenten aptituds com a promotors de creixement de les plantes, ja que presenten gens

que codifiquen pel metabolisme de l'àcid indol-3-acètic que millora els sistema radicular vegetal mitjançant un increment de la capacitat d'absorció de nutrients (Spaepen, Vanderleyden, & Remans, 2007). També, s'ha demostrat que l'activitat insecticida de soques es distribueix en els grup *P. protegens* i *P. chlororaphis* (Flury et al., 2016). És per aquests motius que la identificació dels filogrups d'aïllats del complex *P. fluorescens* esdevé de gran interès per seleccionar soques amb potencial biotecnològic.

Taula 1.2. Característiques dels filogrups del complex *P. fluorescens*. Extret de Kupferschmied et al., (2013) i Garrido-Sanz et al., (2017).

Filogrups	DAPG*	Fenazines	Pirrolnitrines	Resorcinol	Ploluteorina	HCN	Sideròfors	Toxina fit	Bioremediació	Interacció planta-bacteri
<i>P. mandelii</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>P. jessenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. koreensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>P. corrugata</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>P. gessardii</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>P. chlororaphis</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>P. protegens</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

Els mecanismes d'acció mitjançant els quals els bacteris del complex *P. fluorescens* aconseguen eliminar o reduir les malalties o plagues de les plantes són diversos (Figura 1.1). Per una banda, actuen competint amb els fitopatògens presents en la rizosfera per aconseguir nutrients (Mercado-Blanco & Bakker, 2007). Donat que algunes *P. fluorescens* produeixen sideròfors, compostos que segresten el ferro, presenten certs avantatges competitius per colonitzar les arrels envers als fitopatògens, ja que el ferro es troba en baixes quantitats en alguns sòls (Youard, Wenner, & Reimann, 2011). Un altre mecanisme d'acció és l'antibiosi, que es caracteritza per la producció de metabòlits secundaris amb activitats antimicrobianes i antifúngiques (Haas & Keel, 2003). També, hi ha soques capaces d'infectar i matar larves d'insectes a través de la seva ingesta. Per últim, poden reduir malalties a través de l'activació del sistema de defenses de plantes (Bakker, Pieterse, & van Loon, 2007) proporcionant un estat de defensa millorada a la planta gràcies a l'activació per part del bacteri del sistema immunitari (van Loon, Bakker, & Pieterse, 1998).

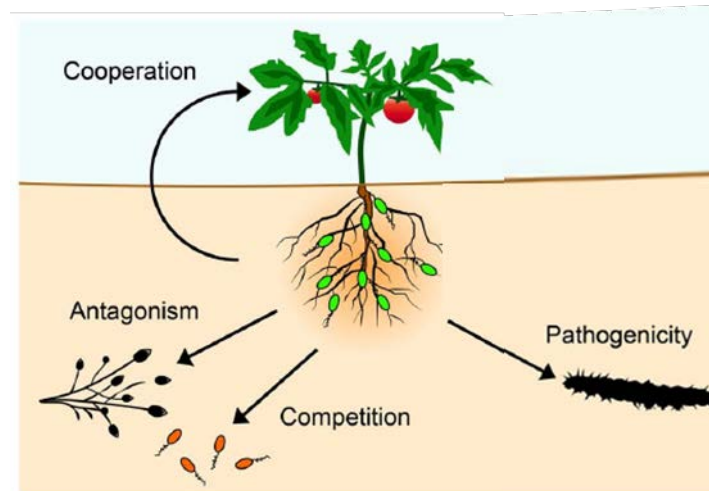


Figura 1.1. Mecanismes d'interacció de *Pseudomonas* amb les plantes i els patògens i plagues. Font: Kupferschmied et al., (2013).

1.5. *P. fluorescens* productores de metabòlits insecticides: toxina fit i HCN

A més de l'aptitud dels bacteris del complex *P. fluorescens* per colonitzar els sòls i protegir les plantes dels fitopatògens, algunes soques poden parasitar insectes i produir metabòlits insecticides (Devi & Kothamasi, 2009; Ruffner et al., 2013). Precisament, algunes són capaces de produir àcid cianhídric (HCN), un compost tòxic per molts organismes degut a la inhibició de l'enzim citocrom c oxidasa de la cadena respiratòria. Aquest metabòlit secundari no és necessari pel creixement d'aquests bacteris, sinó que els proporciona un avantatge competitiu en la rizosfera. Particularment, certes soques de *P. fluorescens* presenten activitat insecticida enfront termites de l'espècie *Odontotermes obesus* (Devi & Kothamasi, 2009).

Recentment, s'han descrit soques de *P. chlororaphis* i *P. protegens* que produeixen una proteïna similar a la toxina insecticida Mcf1 de *Photorhabdus* i *Xenorhabdus*, anomenada toxina fit (Péchy-Tarr et al., 2008; Ruffner et al., 2013). La toxina fit o altrament dit *P. fluorescens* insecticidal toxin, està codificada per un clúster de 8 gens (Figura 1.2). Aquest clúster inclou el gen *fitD* que codifica per la toxina insecticida i els gens *fitA*, *fitB*, *fitC*, *fitE*, *fitF*, *fitG* i *fitH* que codifiquen per proteïnes reguladores i de secreció (Péchy-Tarr et al., 2013). Estudis actuals demostren l'activitat de la toxina fit en *Manduca sexta* i *Galleria melonella* tractades amb les soques de *P. protegens* CHA0 i Pf-5 (Péchy-Tarr et al., 2008) i de *P. chlororaphis* PCL1391 (Flury et al., 2016; Ruffner et al., 2013).

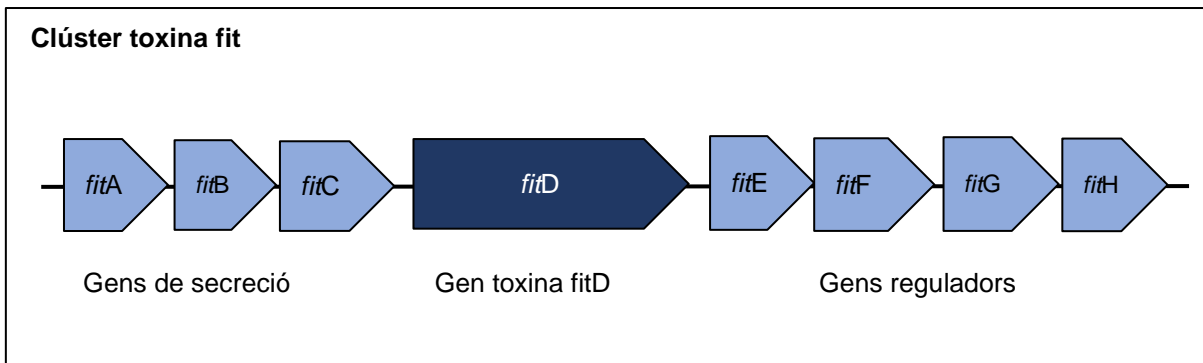


Figura 1.2 Organització del clúster de la toxina insecticida fit.

1.6. Antecedents

Actualment, el Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal (CIDSAV) disposa d'una col·lecció àmpliament caracteritzada de soques del complex *P. fluorescens*. Aquestes es van obtenir a partir de mostres vegetals de diversos orígens i van ser caracteritzades per Bonaterra (1997) i Badosa (2001). Badosa (2001) va dur a terme una anàlisi polifàsica d'aquests aïllats, a través de l'anàlisi fenotípica i genotípica, i identificant la presència de gens de producció de metabòlits antimicrobians.

Altres autors han descrit una sèrie de marcadors moleculars que permeten la classificació de les soques del complex *P. fluorescens* en 8 filogrupos (Garrido-Sanz et al., 2017). Utilitzant aquesta metodologia recentment Périz (2018) va realitzar la classificació de 51 aïllats de la col·lecció del CIDSAV en els 8 filogrupos del complex *P. fluorescens*. En aquest estudi es va posar a punt tota la metodologia que permetia realitzar la classificació mitjançant el patró descrit de presència/absència de 9 marcadors moleculars amb PCR. Donat aquests resultats es podrien seleccionar alguns d'aquests marcadors, que només són positius per algun dels filogrupos, per fer una assignació ràpida a aquests.

1.7. Objectius

L'objectiu general d'aquest treball va ser identificar soques del complex *P. fluorescens* amb potencial de producció de determinats metabòlits per al seu ús com a agents de biocontrol amb activitat insecticida. Donat que l'activitat insecticida de soques segueix una distribució filogenètica, concretament en els grups *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens*, es van establir els objectius específics següents:

1. Assignar les soques de la col·lecció als filogrups *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens*, mitjançant la presència/absència dels marcadors moleculars DGPf_8, DGPf_7 i DGPf_4, respectivament.
2. Detectar la presència de soques productores del metabòlit àcid cianhídric en els filogrups *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens* amb l'amplificació dels gens relacionats.
3. Detectar la presència de soques productores de la toxina fit en els filogrups *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens* mitjançant l'amplificació dels gens relacionats.

2. MATERIAL I MÈTODES

A la Figura 2.1 es mostren les diferents etapes realitzades en el present treball per tal d'assolir els objectius plantejats. En primer lloc, a la Figura 2.1A es mostra el procediment experimental dut a terme per seleccionar les soques del complex *P. fluorescens* de la col·lecció del CIDSAV i obtenir l'ADN. En segon lloc, a la Figura 2.1B es mostren les diferents amplificacions d'ADN realitzades mitjançant la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR). Aquestes es van emprar per detectar diferents marcadors moleculars que permeten identificar les soques dels filogrupos d'interès i també per detectar la presència de gens de producció de metabòlits interessants com a insecticides.

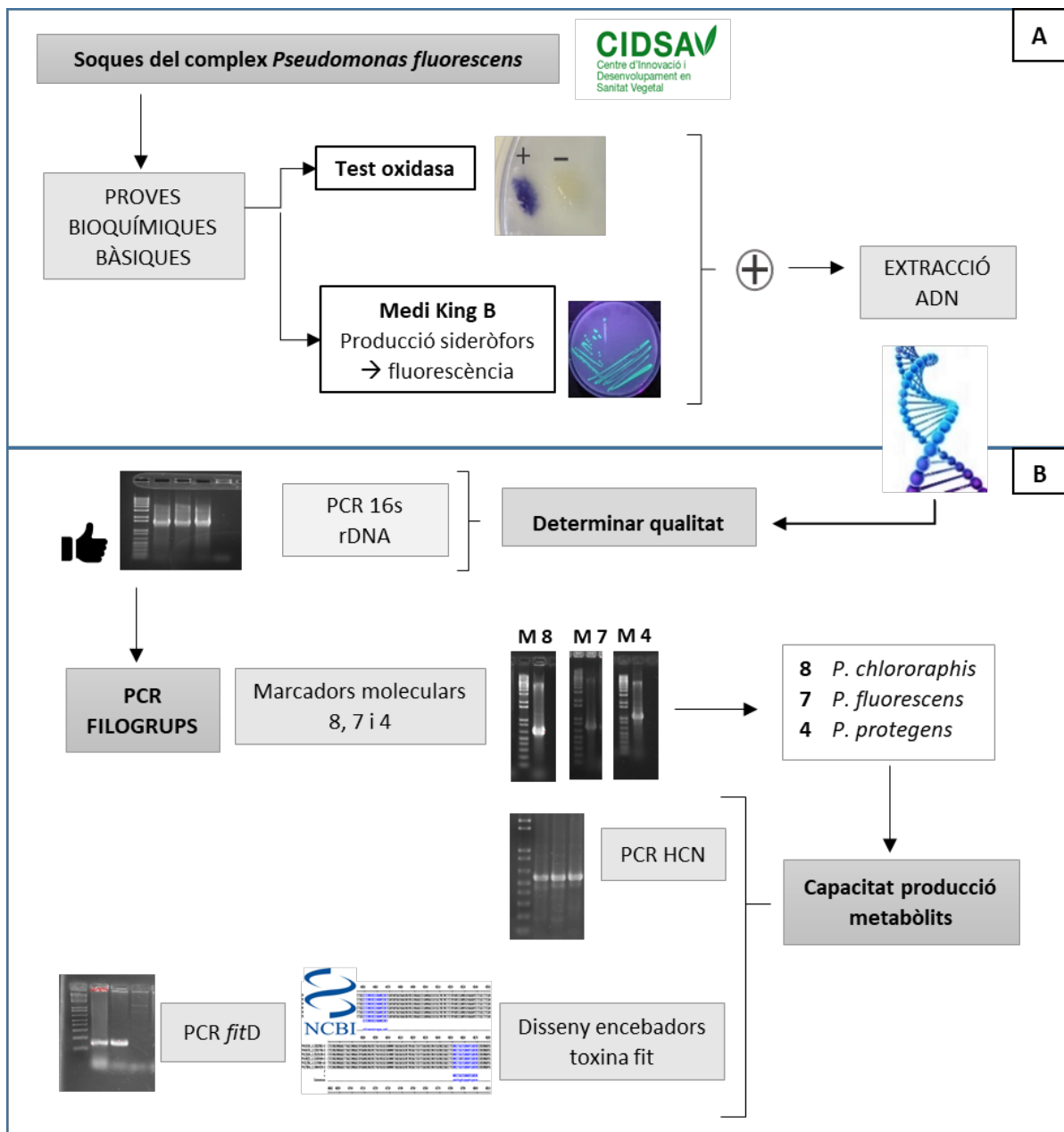


Figura 2.1 Procediment per a la selecció de soques utilitzades en aquest treball fins a l'obtenció de l'ADN (A) i posteriors amplifcacions per PCR dels marcadors de filogrupos i dels gens de síntesi d'àcid cianhídric i de la toxina fit.

2.1. Medis de cultius, tampons i reactius

Agar B de King

15 g	Proteosa peptona
1,5 g	K ₂ HPO ₄
1,5 g	MgSO ₄
10 g	Glicerol
15 g	Agar
1000 ml	H ₂ O destil·lada

Homogeneïtzar i esterilitzar la mescla a 121 °C durant 20 min a l'autoclau. Posteriorment, refredar a 55 °C a bany maria i repartir-ho en plaques de Petri en condicions d'asèpsia.

Tampó TAE (50x)

121 g	Tris base
28,55 ml	Àcid acètic glacial
50 ml	EDTA 0,5M pH 8
350 ml	H ₂ O Mili-Q

Ajustar el pH a 7,5 - 7,8 amb HCl concentrat i ajustar a un volum de 500 ml amb aigua Mili-Q.

Tampó TAE (1x)

Per a preparar la dilució TAE 1x es van utilitzar 20 ml de la solució TAE 50x enrasats a 1 L amb H₂O destil·lada.

Marcador molecular 1KB Ladder

150 µl	H ₂ O destil·lada
10 µl	1KB plus Ladder
40 µl	Tampó de càrrega

Reactius

Taula 2.1 Reactius utilitzats en aquest treball així com la marca i referència del producte comercial.

Nom	Marca	Referència
<i>Dilution Solution</i>	Sigma-Aldrich	D5688
<i>Extraction Solution</i>	Sigma-Aldrich	E7526
PCR Readymix	Sigma-Aldrich	R4775
N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamina	Sigma-Aldrich	T7394
Bromur d'etidi	Sigma-Aldrich	E1510
1Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen	11578636

2.2. Soques bacterianes, selecció i extracció d'ADN

Per al present estudi es va utilitzar una col·lecció de 260 soques del Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal del complex *Pseudomonas fluorescens*, conservades amb glicerol (20%) a -80 °C. Aquestes es van obtenir de mostres vegetals de diversos orígens i van ser aïllades en el transcurs dels treballs realitzats per Bonaterra (1997) i Badosa (2001). A més, es van utilitzar també 7 soques cedides per altres investigadors i 1 de la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus (CECT). A l'annex 1 es detallen les soques emprades i algunes les seves característiques de procedència.

Les soques es van descongelar i sembrar en estria en plaques de Petri amb medi King B sòlid i es van incubar a 23 °C durant 48 h. Posteriorment, es va dur a terme una segona ressebra per assegurar l'obtenció de cultius purs abans de procedir a l'extracció d'ADN.

Per comprovar que les soques utilitzades pertanyien al complex *P. fluorescens* es van realitzar dues proves fenotípiques. En primer lloc, es va confirmar la producció de sideròfors mitjançant la sembra de les soques d'interès en medi King B (presenta baix contingut en ferro). Els sideròfors són compostos quelants de ferro que emeten fluorescència quan s'il·luminen amb llum ultraviolada. En segon lloc, es va dur a terme la prova de l'oxidasa que posa de manifest la presència del citocrom c en la cadena respiratòria del microorganisme. Aquest citocrom és capaç d'oxidar en presència d'oxigen el reactiu N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamina i formar un compost blavós. En cas contrari, no es produeix aquesta oxidació del compost, observant-se un color blanquinós. Remarcant que les soques del complex *P. fluorescens* presenten fluorescència en medi KB sota llum ultraviolada i són oxidasa positives.

Un cop comprovat que es disposaven de cultius purs dels aïllats i que aquests pertanyien al complex *P. fluorescens*, es va procedir a l'extracció d'ADN. Primerament, es va partir de les soques sembrades en medi KB i incubades a 23 °C durant 24 h, es va agafar una colònia i es va resuspendre en 100 µl d'aigua destil·lada en un tub *Eppendorf*, es van afegir 100 µl del tampó d'extracció *Extraction Solution* (SIGMA-ALDRICH) i es va sotmetre a 100 °C durant 30 min en un *Thermoblock* (*ThermoMixer F1.5*, Eppendorf). Passat el temps, es va realitzar una dilució amb 50 µl de la mostra obtinguda i 50 µl del tampó de dilució *Dilution Solution* (SIGMA-ALDRICH) i es va conservar a -20 °C.

2.3. Disseny d'encebadors del gen de la toxina insecticida fit

Es va dur a terme el disseny d'encebadors *in silico* per detectar específicament el gen *fitD*, del clúster *fit* (Ruffner et al., 2013). El primer pas va consistir en cercar la seqüència que codifica pel clúster *fit* a la base de dades GenBank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Un cop obtingut es va seleccionar la seqüència del gen *fitD*, que codifica per la proteïna insecticida. La seqüència es va introduir al programa BLASTn del GenBank (Basic Local Alignment Search Tool de la base de dades de nucleòtids) i es va realitzar la cerca de seqüències similars entre les de la base de dades del GenBank. A la Figura 2.2 es mostra la representació gràfica del clúster *fit*.

Les seqüències obtingudes es van alinear mitjançant el programa MULTALIN (Corpet, 1988) i es van cercar les zones conservades entre elles. Finalment, els encebadors es van dissenyar utilitzant el programa PRIMER3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) on es va introduir la seqüència dels aproximadament 8000 parells de bases del *fitD* i es van escollir els encebadors.

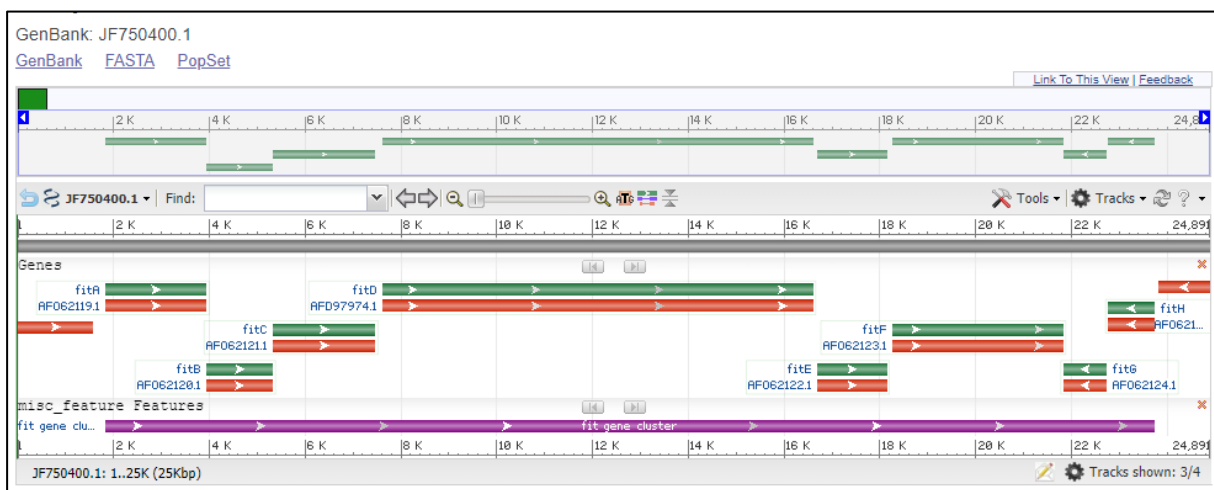


Figura 2.2. Clúster *fit* de la soca *P. chlororaphis* PCL1391 (GenBank: JF750400.1) seqüenciada per Ruffner *et al.* 2013. En color lila, el clúster *fit*; en color verd, els gens *fitA*, *fitB*, *fitC*, *fitD*, *fitE*, *fitF*, *fitG* i *fitH*, i en color vermell, les proteïnes.

2.4. Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)

2.4.1. Encebadors

Al llarg del treball es van utilitzar diversos encebadors per a diferents finalitats d'estudi. En primer lloc es va procedir a l'amplificació del fragment corresponent al 16S rDNA per comprovar la qualitat de l'ADN extret de cadascuna de les soques. Seguidament, amb les mostres que tenien l'ADN extret correctament, es van utilitzar encebadors dirigits a 3 marcadors moleculars específics. Concretament, els marcadors DGPf_8, DGPf_7 i DGPf_4 per a l'assignació dels filogrupos *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens* respectivament. Finalment, amb les soques d'aquests tres filogrupos es va detectar la presència de gens de producció d'àcid cianhídric i de la toxina insecticida *fitD*. A la Taula 2.2 es mostren els encebadors utilitzats i les seves característiques, com ara la seva temperatura d'anellament, la longitud de l'amplicó resultant i les referències.

Taula 2.2 Encebadors utilitzats en el treball per la comprovació de la qualitat de l'ADN, l'assignació als filogrupos i la detecció de gens relacionats amb la producció de metabòlits i toxines.

Encebadors		Seqüència (5' ---> 3')	Tm* (°C)	Amplificó (pb)	Referència
Qualitat ADN	16S rDNA	27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	56	Aprox. 1500	Kitahara et al., 2012
		1492R: TACCTTGTTACGACTT			
Assignació a filogrupos	<i>P. chlororaphis</i>	DGPf_8F: CCCACCGACAGCCAGCAACG	70	661	Garrido-Sanz et al., 2017
		DGPf_8R: CGGTCTTGTGCTGATGCCG			
	<i>P. fluorescens</i>	DGPf_7F: CY*GARATCGAGGGGCTKTGGA	66	745	
		DGPf_7R: GCTGAARTCGGVAGCAGGGC			
	<i>P. protegens</i>	DGPf_4F: CGCTGATCCTCTCGTTGTCTGC	66	1072	
		DGPf_4R: ACGCCCTTGCCACATCG			
Detecció de gens implicats en la producció de metabòlits i toxines	HCN1	PM2: TGCGGCATGGGCGTGTGCCATTGCTGCCTGG	67	570	Svercel et al., 2007
		PM7: CCGCTCTTGATCTGCAATTGCAGGCC			
	HCN2	Acb: ACGATGTGCTCGGCGTAC	63	583	Frapoli et al., 2012
		Aca: ACTGCCAGGGGCGGATGTGC			
	<i>fitD</i> <i>P. protegens</i>	Pr F: CCTCAACACCCSGAAYCACT	60	232	Aquest treball
		Pr R: GTGTCGATCTCGACCAGGTT			
	<i>fitD</i> <i>P. chlororaphis</i>	CL F: ACCACGTTGTCGTACAGCAG	59,5	155	
		CL R: TATGTGGACATTCCAAGCA			

*Tm: temperatura d'anellament; Les bases en negreta corresponen segons la classificació de la IUPAC (Unió Internacional de Química Pura i Aplicada) a: R = G/A (purina), Y=T/C (pirimidina), V= G/C/A (Qualsevol excepte T), S=G/C (enllaços forts), N = A/G/C/T (qualsevol), B=G/T/C (Qualsevol excepte A), H=A/C/T (Qualsevol excepte G) i K=G/T (ceto).

A) Amplificació del 16S rDNA

Per confirmar la qualitat de l'ADN de les mostres es va realitzar l'amplificació per PCR del 16S rDNA utilitzant els encebadors 27F i 1492R (Taula 2.2). Si no s'obtenia amplificació del 16S rDNA, calia realitzar de nou l'extracció de l'ADN, ja que indicava que l'ADN no presentava una qualitat suficient per a permetre l'amplificació.

B) Amplificació de marcadors moleculars per l'assignació dels filogrupos de *P. fluorescens*

Actualment, hi ha 9 marcadors moleculars descrits, que permeten la classificació de les soques del complex *P. fluorescens* en 8 filogrupos (Garrido-Sanz et al., 2017, Taula 2.3). En aquest treball, es van escollir els marcadors DGPf_8, DGPf_7 i DGPf_4 amb l'objectiu d'identificar els aïllats de la col·lecció CIDSAV que pertanyien als filogrupos *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens*. Cadascun d'aquests marcadors només és present en un dels filogrupos d'interès.

Taula 2.3. Presència dels marcadors seleccionats específics en els filogrupos del complex *P. fluorescens* utilitzats en aquest treball (ressaltat en groc). Extret de Garrido-Sanz et al., 2017.

Marcador	Complex <i>Pseudomonas fluorescens</i>							
	<i>P. corrugata</i>	<i>P. koreensis</i>	<i>P. jessenii</i>	<i>P. mandelii</i>	<i>P. gessardii</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. protegens</i>	<i>P. chlororaphis</i>
DGPf_4	-	-	-	-	-	-	+	-
DGPf_7	-	-	-	-	-	+	-	-
DGPf_8	-	-	-	-	-	-	-	+

C) Amplificació de marcadors moleculars de producció d'àcid cianhídric i de la toxina insecticida fitD

A les soques que pertanyien a *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens* identificades per la presència dels marcadors descrits a l'apartat B, es va detectar la presència de gens relacionats amb la producció de metabòlits insecticides com el compost volàtil HCN i la toxina fitD mitjançant amplificació amb encebadors específics (Taula 2.2).

2.4.2. PCR

La preparació del còctel de PCR es va realitzar en condicions asèptiques en una campana de flux laminar, que prèviament s'havia irradiat amb llum ultraviolada durant 15 min. Es van utilitzar 18 µl del còctel amb aigua estèril, els encebadors adients i el kit *Readymix* (SIGMA-ALDRICH), que conté els nucleòtids, l'ADN polimerasa, el tampó de càrrega per a la realització del gel d'electroforesi i la resta de reactius necessaris per fer la PCR, en els volums indicats a la Taula 2.4. Finalment, s'addicionaven 2 µl d'ADN de la mostra fora de la campana de flux laminar.

Taula 2.4 Reactius utilitzats per a preparar el còctel de PCR.

Components	VOLUM (µl)
<i>RedExtract-N-Amp PCR ReadyMix</i>	10
<i>H2O Mili-Q estèril</i>	6
<i>Encebador Forward (10µM)</i>	1
<i>Encebador Reverse (10µM)</i>	1
TOTAL còctel	18

Per a cada PCR que es va portar a terme es va incloure un control positiu i un control negatiu. Per cadascun dels marcadors es van utilitzar les soques detallades a la Taula 2.5 com a controls positius. Per a cada amplificació es va utilitzar un control negatiu per assegurar l'absència de contaminants en el còctel de PCR, utilitzant aigua destil·lada estèril i un control negatiu d'amplificació, consistent en una soca sense el marcador, excepte pels

gens de HCN i *fitD* (Taula 2.5). Pel que fa al 16S rDNA només es va utilitzar un control negatiu d'aigua destil·lada.

Taula 2.5 Soques utilitzades com a controls positius i negatius en les amplificacions dels marcadors filogenètics i dels gens que codifiquen per la biosíntesis de la toxina fit i HCN.

	Soca control +	Soca control -	Marcador
Filogrup			
<i>P. chlororaphis</i>	BL915 ¹	CHA0 ²	DGPf_7
<i>P. fluorescens</i>	Ps2-79 ³	BL915	DGPf_4
<i>P. protegens</i>	CHA0	BL915	DGPf_8
<i>fitD</i>			
<i>P. chlororaphis i</i>	CECT4470 ⁴ i CHA0		CL
<i>Pseudomonas spp.</i>		-	
<i>P. protegens</i>	"		Pr
HCN			
<i>P. chlororaphis</i>	BL915, 210 ⁵ i CHA0	Ps2-79 i SBW25 ⁶	
<i>P. fluorescens</i>	"	-	PM1 i ACB
<i>P. protegens</i>	"	-	

*Procedència:

1 Steve Hill (Novartis Crop Protection, U.S.A.)

2 Gènieve Défago (Institute of Plant Sciences, Switzerland)

3 Linda Thomashow (U.S Department of Agricultural Research, U.S.A.)

4 Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

5 Centre d'Innovació i de Desenvolupament en Sanitat Vegetal (CIDSAV).

6 Mark J. Bailey (Institute of Virology and Environmental Microbiology, England)

A continuació, els tubs Eppendorf amb les mostres de PCR es van col·locar en el termociclador (S1000 *ThermalCycler*, BioRad Laboratories). Les fases del programa de PCR i les condicions de l'amplificació s'especifiquen per cadascun de les reaccions a la Taula 2.6.

Taula 2.6. Fases del programa d'amplificació i condicions utilitzades per l'amplificació del 16S rDNA (A), els marcadors moleculars específics dels filogrups (B), els gens relacionats amb la producció HCN (C) i la toxina fitD (D).

A			B		
Cicles	Temperatura (°C)	Temps	Cicles	Temperatura (°C)	Temps
1	95	5 min	1	95	5 min
30	95	30 s	30	95	30 s
	56	30 s		58/66/67/70*	30 s
	72	1,5 min		72	1,5 min
1	72	7 min	1	72	7 min
1	4	∞	1	4	∞

C			D		
Cicles	Temperatura (°C)	Temps	Cicles	Temperatura (°C)	Temps
1	94	2 min	1	94	2 min
30	94	30 s	30	94	30 s
	67/63	30 s		60/59,5	30 s
	72	1 min		72	1 min
1	72	10 min	1	72	10 min
1	4	∞	1	4	∞

2.4.3. Lectura dels resultats de la PCR: Electroforesi

Finalitzada la PCR, per visualitzar els resultats obtinguts en l'amplificació, es va dur a terme una electroforesi horitzontal amb gel d'agarosa. Es van preparar els gels d'agarosa al 1,5% en tampó TAE 1x si l'amplicó era major de 500 pb i al 2,5% si l'amplicó era menor de 500 pb. El gel es col·locava dins una cubeta d'electroforesi i es recobria amb tampó TAE 1X. Seguidament, es carregava el gel amb 8 µl de cada mostra. També es va utilitzar el marcador de pes molecular *1KB plus Ladder* (Life Technologies) per poder determinar posteriorment la mida del fragment d'ADN amplificat. Un cop carregat el gel es posava en funcionament la font d'electroforesi a 85 V durant 40 min pels gels d'agarosa 1,5 % i de 30 min pels gels d'agarosa de 2,5 %.

Per a la lectura dels resultats, es va procedir a fer la tinció del gel d'agarosa amb Bromur d'Etidi durant 15 min per posteriorment capturar la imatge del gel sota un transil·luminador (*Image ChemiDoc XRS* amb el programa *ImageLab 4.1*) utilitzant llum ultraviolada per visualitzar els fragments d'ADN.

2.5. Seqüenciació de fragments d'amplificació

En el cas del gen *fitD*, donat que es van obtenir alguns resultats positius en algunes soques, es va procedir a la seqüenciació d'alguns dels fragments amplificats. Per a preparar la seqüenciació, es va obtenir una alíquota de 5 µl de la mostra amplificada per PCR i es va col·locar en un tub *Eppendorf* on es van afegir 5 µl de l'encebador antisentit utilitzat (Solament un dels encebadors en cada reacció) per procedir a la seqüenciació d'un sentit del fragment.

Posteriorment, les alíquotes es van trametre a l'empresa MACROGEN (Macrogen, Madrid, Espanya) per a la realització de la seqüenciació. Un cop obtingudes les seqüències en format FASTA, aquestes es van alinear amb les soques de referència del GenBank (Utilitzades per dissenyar els encebadors), els encebadors corresponents i la seqüència del *fitD*.

Finalment, es van comparar les seqüències dels controls positius del GenBank amb les obtingudes de les soques d'estudi.

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. Soques bacterianes i extracció d'ADN

Les 260 soques del complex *P. fluorescens* de la col·lecció del CIDSAV que estaven emmagatzemades en crioconservació a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ van créixer correctament exceptuant les soques 600, 383, 373 i 50E. Aquestes es van ressemar incrementant la quantitat de mostra utilitzada, tot i així, no es va detectar creixement i per això, es va descartar incloure-les en el treball.

En els cultius purs i després d'una incubació de 24 h, es va procedir a realitzar la prova de l'oxidasa (Figura 3.1.A), on totes les soques van donar un resultat positiu, exceptuant les soques 465 i 26E. Alhora, es va observar l'emissió de fluorescència sota llum ultraviolada (Figura 3.1.B), en totes les soques sembrades en medi KB després d'una incubació de 24 h a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les mostres que presentaven un resultat negatiu en la prova d'oxidasa també es van descartar per a continuar el treball. En total, es va realitzar l'estudi amb 254 soques de de la col·lecció del CIDSAV, i es van utilitzar com a referència 7 soques cedides per altres investigadors i 1 soca de la CECT.

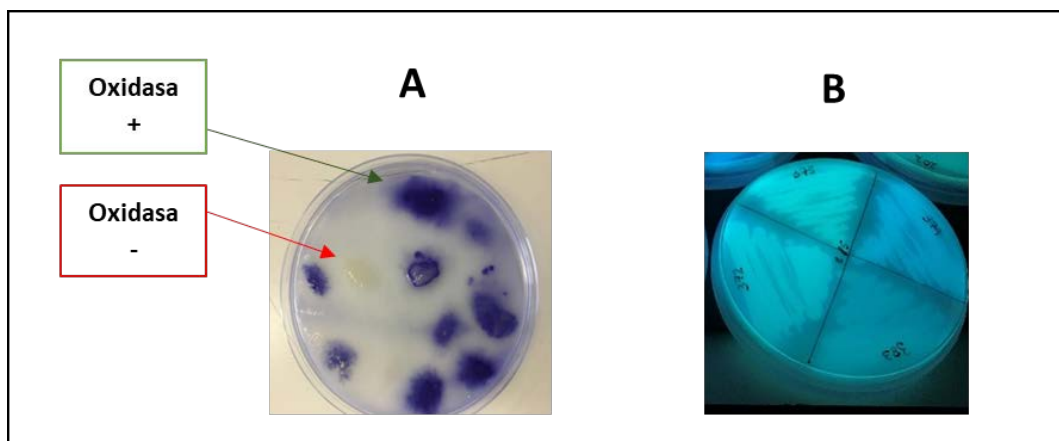


Figura 3.1: Prova oxidasa (A) i l'emissió de fluorescència de cultius de *P. fluorescens* en medi KB sota llum ultraviolada (B).

Pel que fa a l'extracció d'ADN, els resultats posteriors van mostrar que la metodologia del kit d'extracció de la casa comercial Sigma-Aldrich (Utilització d'un tampó d'extracció, ebullició de la mostra i dilució amb un altre tampó) és adequada per a una extracció ràpida i obtenir ADN de qualitat suficient per ser amplificat.

Per a garantir, que l'ADN extret dels cultius bacterians era apte per amplificar, es va procedir a l'amplificació de la seqüència del 16S rDNA. A la Figura 3.2 es mostren els resultats d'aquesta amplificació en alguns dels aïllats. L'obtenció dels fragments amplificats implicava que es podien utilitzar les extraccions per la realització de les PCR específiques de marcadors moleculars i de detecció de gens biosintètics dels metabòlits d'interès.

En definitiva, els resultats obtinguts en les amplificacions del 16S rDNA de les mostres demostren l'obtenció d'ADN de qualitat mitjançant el kit d'extracció que va escollir Pérez M. (2018) en el seu treball.

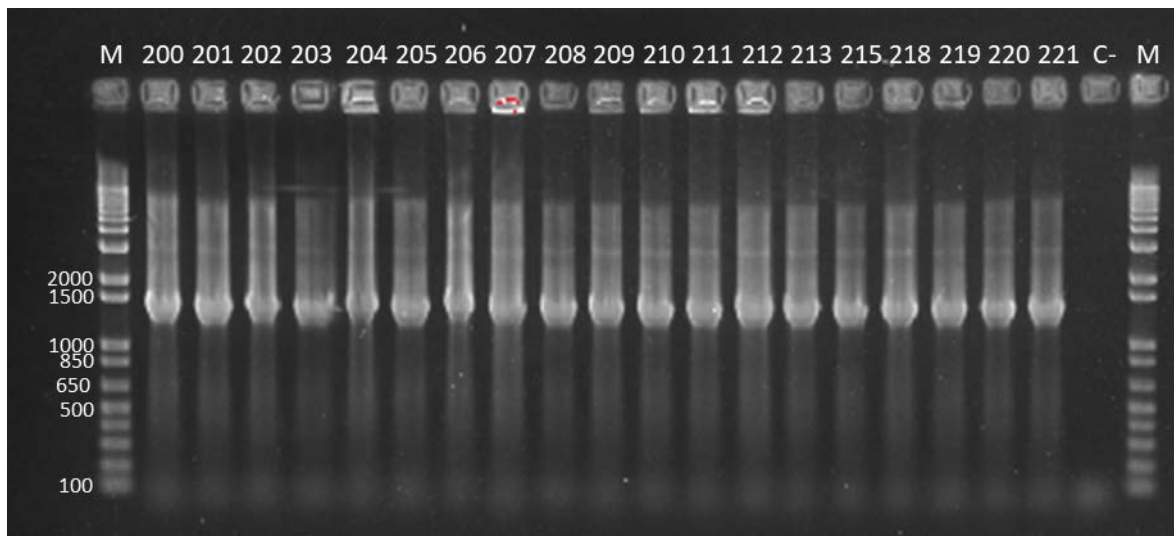


Figura 3.2 Gel d'electroforesi corresponent a l'amplificació del 16S rDNA on s'observa en els dos carrils dels extrems (M), el marcador de pes molecular 1KB Plus Ladder i els resultats de les soques i el control negatiu d'aigua(C-).

Recapitulant, les soques que eren oxidasa negatives es van descartar donat que es volia seleccionar únicament les soques del complex *P. fluorescens*, totes elles oxidasa positives, hi ha algunes espècies de *Pseudomonas* com *P. syringae* que són oxidasa negatives i fluorescents en medi KB sota llum ultraviolada (Hirano, 2000). Aquests són bacteris fitopatògens i són molt abundants en les mostres vegetals. Per tant, no podien pertànyer al complex de *P. fluorescens* objecte d'aquest treball. En referència al mètode d'extracció d'ADN, els nostres resultats coincideixen amb els obtinguts per Pérez M. (2018), que va provar dos mètodes d'extracció d'ADN i va escollir aquesta metodologia pels bons resultats en la qualitat de l'ADN obtingut.

3.2. Assignació dels aïllats de *P. fluorescens* als filogrupos d'interès

Per identificar quins dels aïllats de la col·lecció del CIDSAV pertanyien als filogrupos *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens* es van utilitzar una sèrie de marcadors moleculars desenvolupats per Garrido-Sanz et al., (2017) i que s'han descrit a la Taula 2.3.

En primer lloc, es va realitzar una amplificació dels marcadors DGPf_4, DGPf_7 i DGPf_8 utilitzant les soques escollides com a controls positius (CHA0 pel marcador DGPf_4, PS2-79 pel marcador DGPf_7 i BL915 pel marcador DGPf_8,) per tal de determinar que els còctels de PCR i les condicions d'amplificació eren les adequades. A la Figura 3.3 es pot observar clarament l'amplificació d'aquests marcadors amb els controls positius.

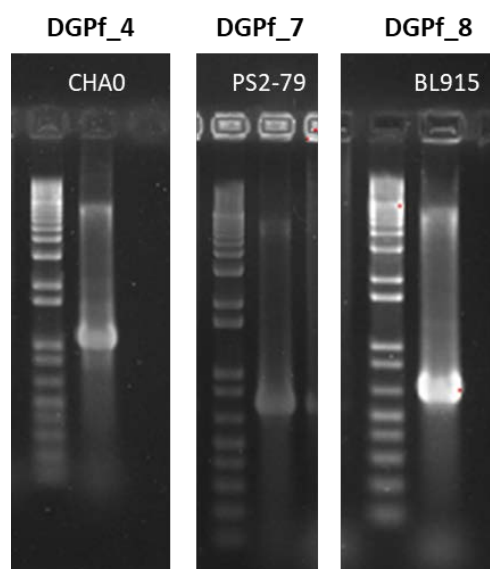


Figura 3.3 Gels d'electroforesi corresponents a l'amplificació dels marcadors DGPf_4, DGPf_7 i DGPf_8, en els controls positius *P. protegens* CHAO, *P. fluorescens* Ps-2-79 i *P. chlororaphis* BL915 respectivament. El marcador de pes molecular utilitzat és el 1Kb plus ladder.

Seguidament, es van analitzar les 262 soques amb els 3 parells d'encebadors i es van obtenir els resultats que s'exposen a la Taula 3.4. De les 254 soques del CIDSAV, es van identificar 101 del filogrup *P. fluorescens*, 4 de *P. chlororaphis* i cap de *P. protegens*. De les soques cedides, es van detectar 1 de *P. fluorescens*, 1 de *P. chlororaphis* i 2 de *P. protegens*. A la Taula 3.5 es mostra l'origen d'aïllament del total de soques identificades.

Taula 3.4 Soques identificades en els filogrups *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens*.

Filogrups	Soques positives en els marcadors		
	DGPf_7 +	DGPf_8 +	DGPf_4 +
<i>P. chlororaphis</i>	-	BL915 , CECT4470 , 275, 277, 279, 299,	
<i>P. fluorescens</i>	PS2-79 , SBW25 , 210, 227, 233, 234, 236, 237, 238, 239, 241, 242, 243, 245, 247, 293, 298, 301, 305, 328, 338, 339, 340, 341, 343, 344, 345, 346, 347, 350, 351, 354, 356, 357, 358, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 374, 375, 377, 378, 381, 382, 384, 421, 422, 424, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 537, 538, 539, 550, 555, 578, 579, 580, 581, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 597, 599, 602, 664A, 684A, 702A, 720A, 735A, 27E, 53E, 62E, 82E, 87E, 95E, 102E, 173E, 251E, 895, 894, 945.	-	-
<i>P. protegens</i>	-	-	CHA0 , WB1 , WB52

Nota: Les soques es troben classificades segons si resulten positives en la presència dels marcadors moleculars. En negre, es mostren les soques de la col·lecció del CIDSAV, en subratllat, les utilitzades com a controls positius per a cada marcador molecular, en blau, les cedides per altres investigadors i en verd, la soca de la CECT.

Taula 3.5. Origen d'aïllament de les soques del CIDSAV utilitzades en el treball.

Òrgan d'origen	Totes les soques	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. chlororaphis</i>
Arrel	132	18	4
Borró	45	33	-
Fulla	38	21	-
Flor	20	16	-
Fruit	15	4	-
Tronc	2	2	-
Substrat	1	-	-
No determinat	7	7	-
TOTALS	260	101	4

En l'assignació de les soques de la col·lecció del CIDSAV als filogrupos d'interès, s'observa que un 39,7% de les soques han estat identificades en el filogrup de *P. fluorescens*, un 1,5% en *P. chlororaphis* i cap en *P. protegens*. Això suposa que la presència dels filogrupos *P. protegens* i *P. chlororaphis* és molt baixa en comparació amb *P. fluorescens*. La resta de les soques de la col·lecció, un 58,6% es trobaven en els altres filogrupos del complex *P. fluorescens* no estudiats en el present treball. Donat que aquesta classificació en filogrupos és molt recent (Garrido-Sanz et al., 2017) no s'han pogut comparar les nostres dades amb les d'altres col·leccions.

Les soques identificades en els filogrupos *P. fluorescens* i *P. protegens* presenten una elevada capacitat de ser actives com a agents de biocontrol, concretament com a nematocides i insecticides. Per aquest motiu eren d'interès en aquest treball.

Dins del complex de *P. fluorescens*, es destaquen certs filogrupos productors de metabòlits actius en el control biològic com les soques de *P. corrugata* (Fenazines, Pioluteorines i HCN) tot i que algunes d'elles poden ser fitopatògenes, i els filogrupos *P. chlororaphis* i *P. protegens* destaquen per la producció de diferents metabòlits (2,4-diacetilfloroglucinol, pioluteorina, pirrolnitrina i fenazines) i per presentar activitat insecticida (Garrido-Sanz et al., 2017). Convé ressaltar que en els darrers anys, gràcies a les noves eines disponibles, molts agents de control biològic s'han reubicat en aquests filogrupos i per això les soques MP12 o CHAO actualment estan considerades com a *P. protegens* (Andreolli et al., 2019; Ramette et al., 2011). No és d'estranyar doncs que hi ha moltes publicacions que descriuen soques de *P. protegens* i *P. chlororaphis* per la seva importància en el biocontrol.

Fins al moment, no tenim constància d'un estudi similar al nostre en què es cerquin aquests filogrupos en una col·lecció d'aïllats com la que disposa el CIDSAV per dur a terme una comparació de l'abundància d'aquestes espècies en el medi.

3.3. Presència de gens de producció d'àcid cianhídric

Utilitzant les soques identificades com a *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens*, es va analitzar la presència de gens productors de metabòlits insecticides com el compost volàtil HCN. Aquest procés es va dur a terme mitjançant l'amplificació dels marcadors moleculars específics relacionats amb la producció de l'àcid cianhídric HCN1 i HCN2.

Donat que es disposava de dos parells d'encebadors, es van comprovar els dos dissenys amb soques que presumiblement eren productores d'àcid cianhídric. Concretament, les soques utilitzades per aquest estudi van ser: *P. chlororaphis* BL915, *P. fluorescens* 210, *P. protegens* CHA0 i també, es va utilitzar *P. corrugata* Q487. Aquestes havien estat analitzades per Badosa (2001), mitjançant altres mètodes analítics. Concretament, es va utilitzar el mètode del picrat alcalí que es basava en realitzar sèmbers dels bacteris en picada en el tub on s'introduïa una tira de paper de filtre estèril impregnada amb picrat alcalí de color groc i es deixaven incubar 3 dies a 22-25 °C. Si les tires viraven a un color taronja intens indicava que les soques eren positives en la producció d'àcid cianhídric.

A la Figura 3.4 es mostren els resultats obtinguts en l'amplificació dels dos parells d'encebadors en soques productores d'àcid cianhídric. S'observen les amplificacions obtingudes amb els encebadors HCN1 que amplifiquen un fragment de 570 pb i les obtingudes amb els encebadors corresponents a HCN2 d'una mida de 586 pb. Com es pot veure, els resultats de l'amplificació d'algunes soques amb els encebadors HCN2 presenten multibandes, fet que dóna a plantejar-se la seva especificitat. Per aquest motiu, es va decidir utilitzar l'HCN1 per analitzar la resta de soques del treball, ja que presenta millors resultats. Per altra banda, cal destacar que en cap dels dos encebadors es va observar amplificació en l'aïllat 210.

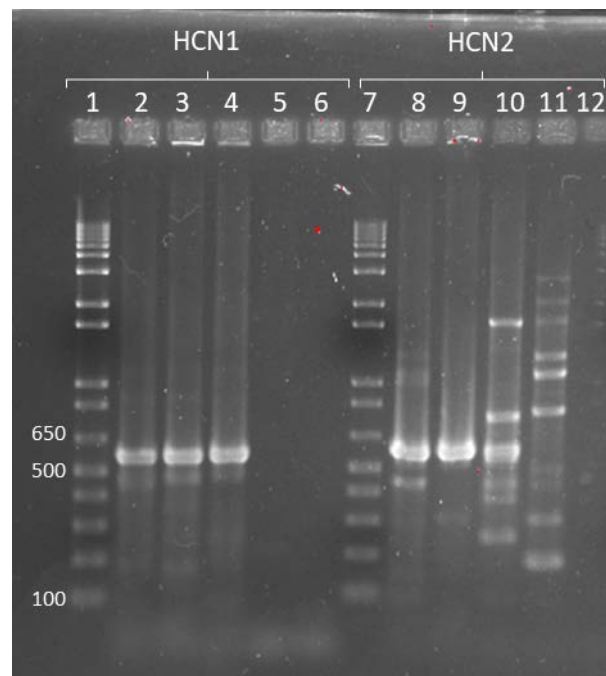


Figura 3.4 Gels d'electroforesi corresponents a l'amplificació dels marcadors relacionats amb la producció de HCN. Marcadors de pes molecular 1KB Ladder (carrils 1 i 7) i les soques CHA0 (2, 8), Q487 (3,9), BL915 (4,10), 210 (5, 11) i el control negatiu d'aigua (6, 12) amplificades amb els encebadors.

A partir de l'encebador HCN1 es van analitzar tots els aïllats dels grups d'interès. En total, es van detectar 6 soques positives corresponents al filogrup *P. fluorescens* i que van ser aïllades d'arrels. De totes les *P. fluorescens* aïllades d'arrel (Taula 3.5), un 33% van presentar el gen *HCN1*.

Amb més detall, a la Taula 3.6 es troben indicades les soques que van resultar positives en *HCN1*. Com a exemple d'aquests resultats, a la Figura 3.5 es contemplen algunes d'aquestes mostres que van amplificar amb els controls positius. Es pot observar que en alguns casos es va obtenir una amplificació d'un fragment de diferent mida a l'esperada, pel que es van considerar resultats inespecífics.

Taula 3.6 Soques que presenten el gen de producció d'HCN.

Filogrups	Soques positives
	HCN1
<i>P. protegens</i>	<u>CHA0</u> , <u>WB1</u> , <u>WB52</u>
<i>P. fluorescens</i>	233, 234, 236, 237, 238, 239,
<i>P. chlororaphis</i>	<u>BL915</u> , <u>CECT 4470</u>

Nota: En negre, es mostren les soques de la col·lecció del CIDSAV, en subratllat, les utilitzades com a controls positius per a cada marcador molecular, en blau, les cedides per altres investigadors i en verd, la soca de la CECT.

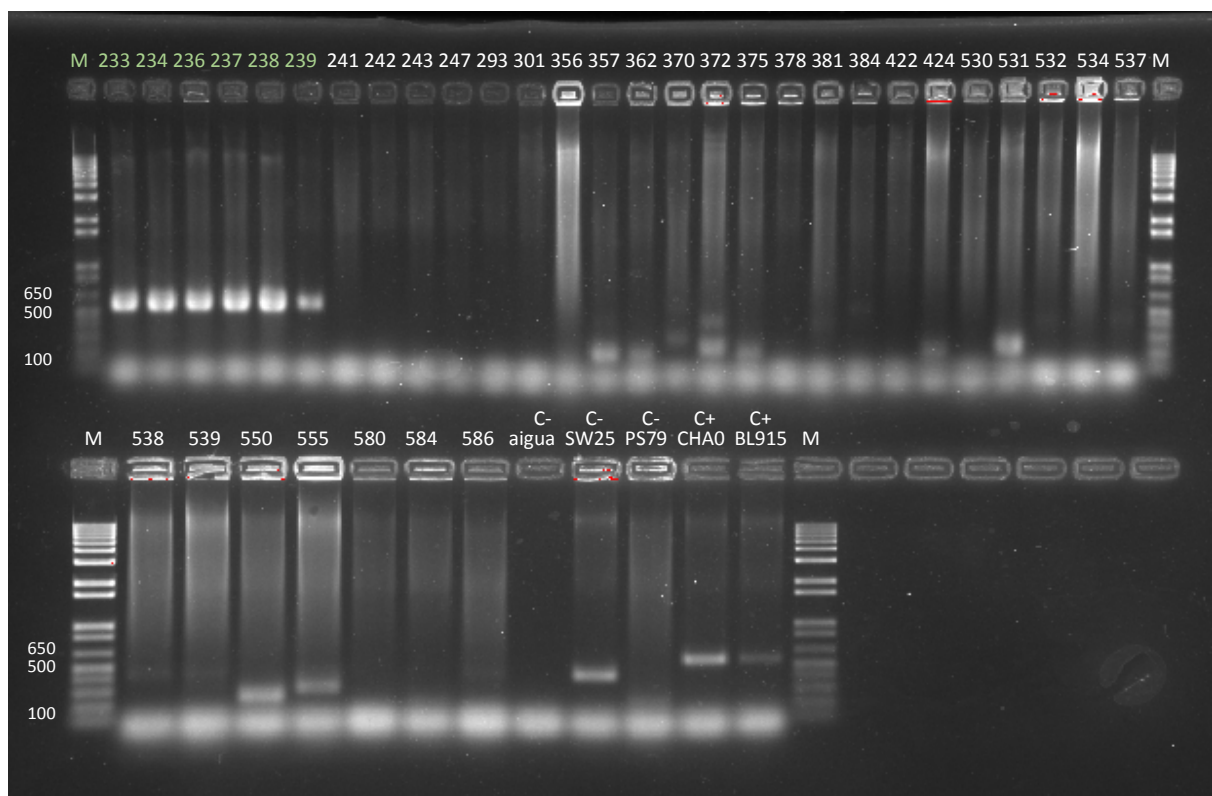


Figura 3.5 Gels d'electroforesi corresponents a l'amplificació del marcador molecular HCN1. S'observa el marcador de pes molecular 1KB Plus Ladder (M), els controls positius (C+), els controls negatius (C-) i en verd, les soques que presenten el gen d'interès

En aquest treball no es van obtenir resultats positius en la soca 210 (Figura 3.4) tot i que Badosa (2001) va comprovar que aquesta soca és productora de cianhídric, mitjançant el mètode de picrat alcalí. Una hipòtesi per la qual no s'hagi pogut detectar amb els marcadors moleculars utilitzats és que el gen que presenta aquesta soca que codifica per la producció del HCN sigui diferent del que es detecta amb els encebadors utilitzats.

S'ha pogut observar que hi ha una elevada presència de soques de *P. fluorescens* aïllades d'arrels que presenten el gen de producció d'HCN. Concretament, un 33%, mentre que no s'ha obtingut cap soca aïllada d'altres òrgans de la planta que el presentés. Per acabar de comprovar les soques que han resultat positives, es podrien seqüenciar els fragments obtinguts en la PCR o realitzar les anàlisis de detecció del metabòlit amb el mètode de picrat alcalí.

Molts bacteris produeixen àcid cianhídric a través de la síntesi *de novo*, la producció d'aquest metabòlit té un paper important en la competència entre microorganismes degut als efectes inhibidors que té aquest metabòlit (Blumer & Haas, 2000). En concret, s'ha estudiat l'HCN pel seu paper en el biocontrol donat que s'ha confirmat com a mecanisme responsable en la reducció de diverses malalties causades per fongs. Precisament, els bacteris productors d'àcid cianhídric més predominants pertanyen al gènere *Pseudomonas* (Rijavec & Lapanje, 2017). Els mateixos autors, posen de manifest que la presència de bacteris productors d'HCN depèn molt dels microhàbitats i del lloc associat, a la planta o al sòl. Així per exemple, van trobar major incidència de bacteris productors d'àcid cianhídric en sòls de tipus àcids que bàsics. Dins del grup *Pseudomonas*, ja a l'any 1974, Castric va realitzar un estudi amb 25 espècies diferents de bacteris i fongs, i solament va detectar la producció d'HCN en *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* i *P. polycolor*. Tots aquests estudis concorden amb els resultats obtinguts en aquest treball, perquè les úniques soques detectades com a productores d'àcid cianhídric pertanyen al filogrup *P. fluorescens*, aïllades de les arrels de les plantes, presents en els sòls.

3.4. Presència de gens de producció de la toxina fit

Es va dur a terme una cerca bibliogràfica per comprovar si hi havia encebadors descrits per a detectar els gens de producció de la toxina fit. Concretament, a l'estudi de Ruffner et al., (2015) es descrivien uns encebadors que permetien identificar aquest gen. Es va realitzar una anàlisi *in silico* i es va observar que no hibridaven correctament amb les soques pertanyents al grup de *P. chlororaphis*. Per aquest motiu, no es van utilitzar en aquest treball i es va decidir dissenyar nous encebadors.

Les seqüències nucleotídiques del gen *fitD* obtingudes amb l'eina BLASTn disponible a la pàgina del GenBank, es van introduir al programa d'alineament múltiple MULTALIN per tal d'analitzar la similitud entre elles. Es van observar diferències entre les seqüències de les soques pertanyents a les espècies *P. protegens*, *P. chlororaphis* i *Pseudomonas* sp. A la Figura 3.6 es mostra com els grups *P. chlororaphis* i *Pseudomonas* sp. presenten majors zones conservades (idèntica o similar seqüència) que les soques de *P. protegens*. Donat aquest fet, es va valorar que no era possible utilitzar el parell d'encebadors, que s'havien dissenyat específicament per detectar el gen, capaç d'amplificar el gen en totes les soques.

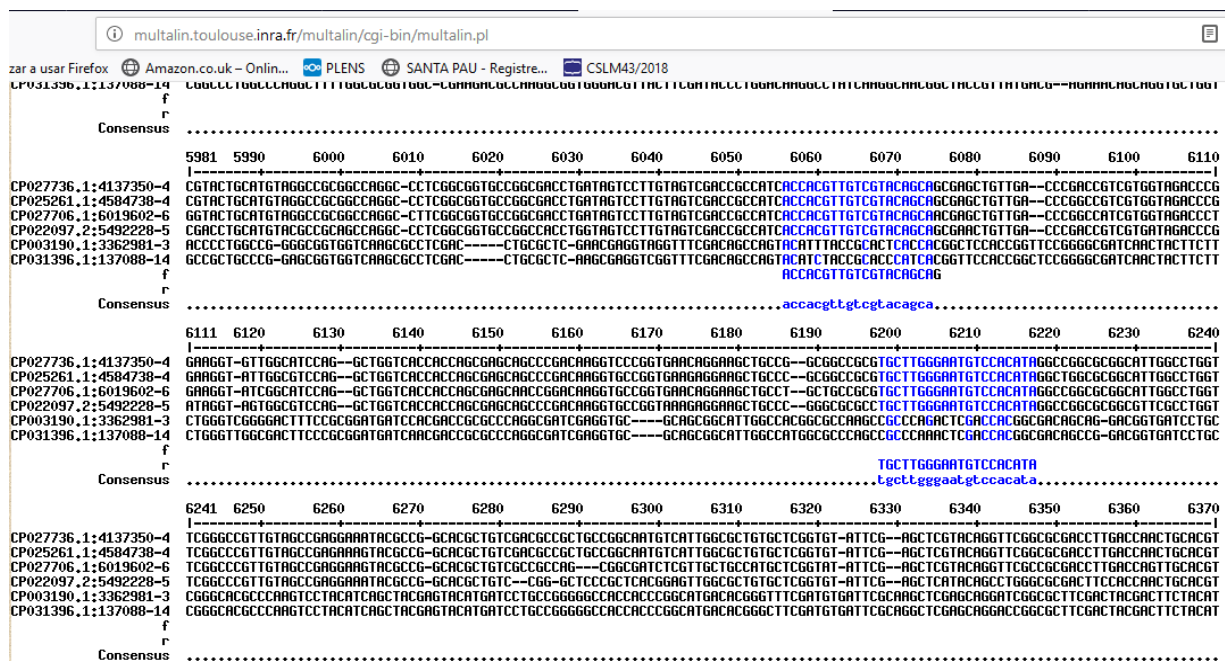


Figura 3.6 Alineació de les seqüències de l'encebador *fitD* CL amb les seqüències de les soques *P. chlororaphis* subsp. piscium PCL1391 (GenBank: CP027736.1), *Pseudomonas* sp. 09C 129 (GenBank: CP025261.1), *Pseudomonas* sp. CMR12a (GenBank: CP027706.1), *P. protegens* FDAARGOS_307 (GenBank: CP022097.2), *P. protegens* CHA0 (GenBank: CP003190.1), *P. protegens* FD6 (GenBank: CP031396.1).

Per tant, es va considerar que els encebadors *fitD* CL dissenyats en un inici eren adients per detectar *fitD* en *P. chlororaphis* i altres soques de *Pseudomonas* sp., (Figura 3.7A) però no per *P. protegens*. Així doncs, es va decidir dissenyar també un parell d'encebadors específics per *P. protegens*, *fitD* Pr (Figura 3.7B). Destacar que en aquest disseny es van introduir dues bases degenerades per poder garantir una millor hibridació dels encebadors (Taula 2.2).

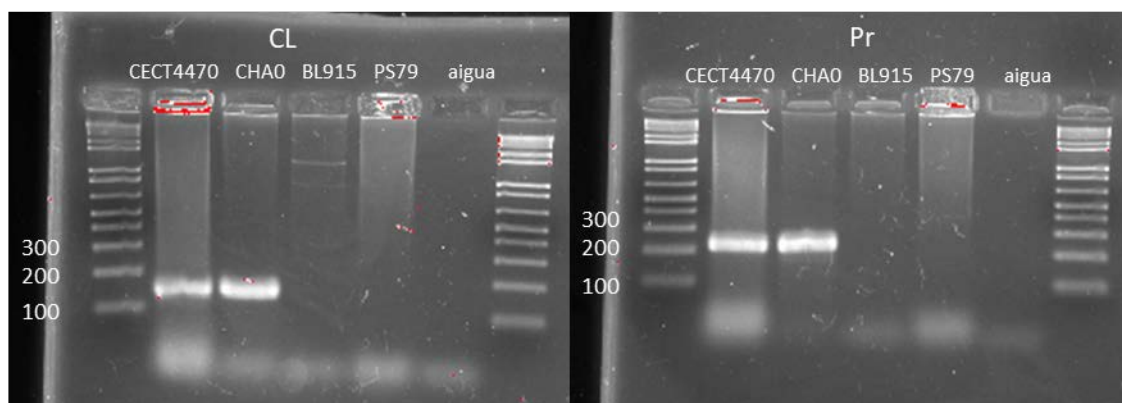


Figura 3.8 Gels de l'electroforesi corresponents a l'amplificació dels marcadors CL i Pr. Es va utilitzar el marcador de pes molecular 1KB Ladder i les cadascuna de les soques utilitzades.

Seguidament, es va determinar la presència del gen *fitD* en les soques identificades en els filogrupos *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens*. Les soques que van mostrar presència del *fitD* amb els marcadors CL o Pr es troben recollides a la Taula 3.7. En concret, es van obtenir resultats positius en algunes soques dels tres filogrupos amb els dos encebadors que s'havien dissenyat específicament per detectar diferents regions del *fitD* en les espècies *P. protegens* i *P. chlororaphis*. Alhora, en algunes soques es van obtenir resultats positius amb un dels encebadors. Per aquest motiu, es va procedir a la seqüenciació d'algunes mostres per tal de verificar si els fragments es corresponien o no al gen *fitD*.

Taula 3.7 Soques que presenten els marcadors CL i Pr del *fitD*.

Filogrupos	Soques positives en els marcadors del <i>fitD</i>	
	CL	Pr
<i>P. protegens</i>	CHA0 , WB1 , WB52	CHA0 , WB1 , WB52
<i>P. fluorescens</i>	95E, 591, 378, 377, 375, 357, 338, 328, 227	356, 375, 377, 173E
<i>P. chlororaphis</i>	CECT 4470 , 277	CECT 4470

Nota: En negre, es mostren les soques del CIDSAV, en subratllat, les utilitzades com a controls positius per a cada marcador molecular, en blau, les cedides per altres investigadors i en verd, la soca de la CECT.

Després d'obtenir la seqüència i fer els alineaments amb les soques de referència del GenBank que s'havien utilitzat per dissenyar els encebadors, es podrien resumir els resultats amb l'esquema que es mostra a la Figura 3.9. En aquesta, s'observa que es van dissenyar els encebadors en una regió específica i diferent del gen *fitD* en cada espècie (Encebadors dissenyats *in silico*). Els resultats obtinguts amb els encebadors *fitD* Pr dissenyats per *P. protegens* (Part esquerra de l'esquema) indiquen que s'han amplificat fragments idèntics als esperats en les soques de *P. chlororaphis* CECT 4470 i de *P. protegens* CHAO, WB1 i WB52. Tanmateix, les amplificacions que es van obtenir en algunes soques de *P. fluorescens* les seqüències obtingudes mostren que no es corresponen a la seqüència del *fitD*.

Amb els encebadors fitD CL dissenyats per *P. chlororaphis* (Part dreta de l'esquema), s'han amplificat fragments molt similars als esperats en les soques de *P. chlororaphis* CECT 4470 i de *P. protegens* CHAO, WB1 i WB52, i amb les amplificacions que es van obtenir en algunes soques de *P. fluorescens* les seqüències obtingudes mostren que no es corresponen a la seqüència del fitD.

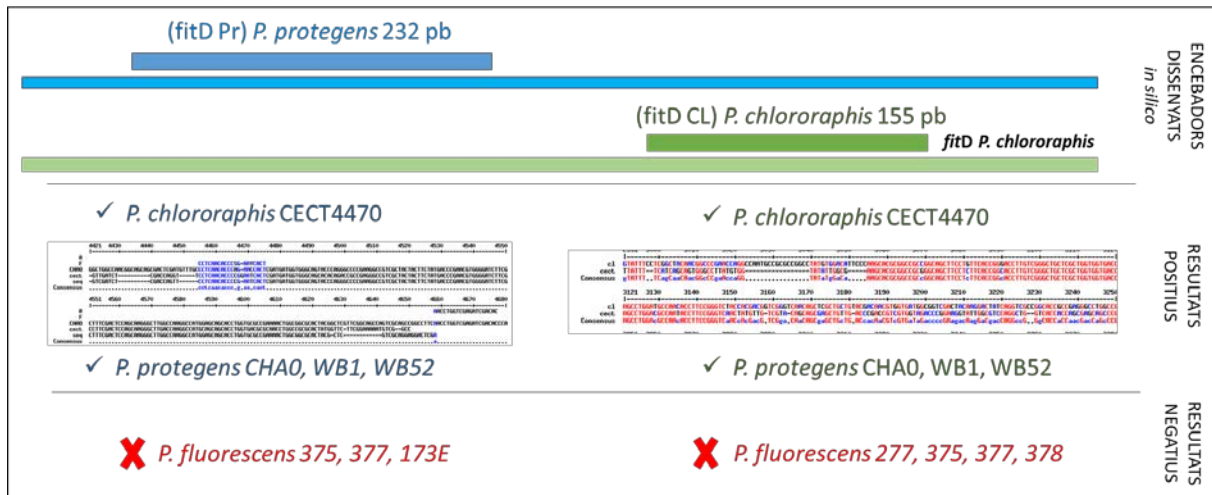


Figura 3.9 Interpretació de la seqüenciació dels fragments positius en l'amplificació del gen *fitD* amb els encebadors dissenyats, amb les seqüències del GenBank. *fitD* i el fragment amplificat pels encebadors dissenyats per *P. protegens* (en blau) i *P. chlororaphis* (en verd)..

Destacar que les soques *P. chlororaphis* CECT4470 i *P. protegens* CHAO i WB1 semblen indicar que es podria utilitzar qualsevol dels dos encebadors per detectar la presència del gen *fitD*. Això estaria d'acord amb els resultats obtinguts per Ruffner et al. (2013), perquè havien dissenyat un sol parell d'encebadors que no vam provar degut a que no observàvem una elevada especificitat en les dues espècies en les anàlisis *in silico*. Cal destacar que no s'ha pogut comprovar si amb alguna altra soca de *P. chlororaphis* amplifica amb els encebadors dissenyats per *P. protegens*. Per tant, els resultats semblarien indicar que utilitzant els encebadors fitD CL podria ser suficient per detectar la presència dels gens en les dues espècies.

Amb posterioritat en les seqüències obtingudes de *P. fluorescens* es van cercar les similituds amb seqüències presents en el GenBank utilitzant l'eina Blast i la majoria presentaven un alineament d'uns 100 pb amb una proteïna DnaA, iniciadora de la replicació del cromosoma en *P. fluorescens*. Aquest fet demostra que cap dels dos encebadors és realment específic pel gen si s'utilitza en soques de *P. fluorescens*. De fet, la producció de la toxina fit, només s'ha descrit fins al moment en *P. protegens* (Péchy-Tarr et al., 2013, 2008) i *P. chlororaphis* (Ruffner et al., 2013). Segons Flury et al. (2017), l'activitat insecticida de *P. chlororaphis* sembla ser deguda a diversos factors i es creu que molts d'ells encara han de ser descoberts.

Donat que algunes vegades s'obtenen fragments que es corresponen més o menys amb la mida del fragment d'interès, però que són seqüències diferents, es podria dur a terme una restricció amb enzims dels fragments que s'obtinguessin en la PCR. D'aquesta manera es comprovaria indirectament la seqüència dels fragments i no caldria realitzar tantes seqüenciacions.

3.5. Discussió general

La taxonomia del gènere *Pseudomonas* ha patit molts canvis al llarg dels anys. En concret, la classificació de les espècies en subclasses ha anat millorant a mesura que han sorgit nous mètodes moleculars com els descrits per Garrido-Sanz et al., (2016, 2017). Aquests es basen en la presència/absència d'un patró de nou marcadors moleculars que permeten classificar en 8 filogrupos el complex *Pseudomonas fluorescens*. A més, s'ha observat que les característiques relacionades amb l'activitat de control biològic es troben distribuïdes filogenèticament entre els filogrupos. Precisament, l'activitat insecticida està descrita en *P. fluorescens* per la producció d'àcid cianhídric (Loper et al., 2012), i *P. chlororaphis* (Ruffner et al., 2013) i *P. protegens* (Péchy-Tarr et al., 2008) per la producció de la toxina fit. Per aquest motiu, aquests tres filogrupos esdevenen d'interès en aquest estudi.

En l'assignació de les soques de la col·lecció del CIDSAV, s'ha detectat que un 39,7% són *P. fluorescens*, un 1,5% *P. chlororaphis* i cap *P. protegens*. La presència d'aquests dos últims grups és molt baixa envers al primer. Malauradament, no s'ha pogut comparar dades d'aquesta investigació amb les d'altres col·leccions, ja que la classificació en filogrupos és molt recent. És degut a aquests nous mètodes de classificació que s'han reubicat en aquests filogrupos molts dels agents de control biològic coneguts. Com per exemple les soques MP12 i CHA0, actualment determinades com a *P. protegens* (Andreolli et al., 2019; Ramette et al., 2011).

Tot i que Rijavec et al., (2017) descriuen *Pseudomonas* com els bacteris més predominants de la producció d'àcid cianhídric, en les soques del CIDSAV dels tres filogrupos d'interès, només s'ha detectat la presència en *P. fluorescens* aïllades de l'arrel. Concretament, 6 de 18 soques (33%). Mentre que no s'ha obtingut cap soca que fos aïllada d'altres òrgans de la planta. I és que, el mateix autor determina que el microhàbitat d'aïllament influeix en la presència de bacteris productors d'HCN. En aquest estudi, els resultats demostren que existeix major probabilitat en soques que provenen d'arrels que en les d'altres òrgans.

Pel que fa a la toxina fit, en un principi es van obtenir fragments amplificats de mida similar als esperats pel gen *fitD* en soques de *P. fluorescens*. Per confirmar aquests resultats, es va dur a terme la seva seqüenciació, els resultats demostren que la seqüència no pertany al gen *fitD*. De fet la presència de la toxina fit no està descrita en aquest filogrup segons Kupferschmied et al., (2013), només s'ha detectat en *P. chlororaphis* i *P. protegens*.

Mitjançant les alineacions de les seqüències amplificades amb els encebadors Pr i CL, s'ha pogut observar que utilitzant l'encebador CL es podria detectar la presència del gen *fitD* en les soques de *P. chlororaphis* i *P. protegens*. Aquesta conclusió estaria d'acord amb els resultats obtinguts per Ruffner et al., (2013), degut a que obtenien amplificacions en els dos filogrups utilitzant un sol parell d'encebadors que *in silico* anellen amb *P. chlororaphis*.

En aquest treball s'han seleccionat soques d'interès del complex *P. fluorescens* amb potencial com a insecticides, mitjançant la utilització de marcadors moleculars prèviament descrits. Donat que les soques de la col·lecció presentaven baixa freqüència en la producció dels metabòlits d'interès, en properes investigacions, es podrien cercar nous aïllats utilitzant els encebadors dissenyats en aquest estudi.

4. CONCLUSIONS

1. Un total de 254 de les 260 soques de la col·lecció del CIDSAV van ser seleccionades per presentar les característiques fenotípiques corresponents al complex de *Pseudomonas fluorescens*, oxidasa positives i fluorescència en medi B de King. A més, es va obtenir ADN de qualitat amb el kit d'extracció utilitzat.
2. Els marcadors moleculars DGPf_4, DGPf_7 i DGPf_8 són útils per realitzar una assignació ràpida de les soques del complex *Pseudomonas fluorescens* en els filogrups *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* i *P. protegens*. De la col·lecció del CIDSAV s'ha detectat un 39,7% de *P. fluorescens*, un 1,5% de *P. chlororaphis* i cap de *P. protegens*. La presència de d'aquests dos darrers filogrups és molt reduïda en la col·lecció del CIDSAV.
3. Els encebadors HCN1 mostren major especificitat que els HCN2 per a la detecció dels gens de producció de l'àcid cianhídric. Només 6 soques del filogrup *P. fluorescens* presenten el gen de producció d'àcid cianhídric, totes elles havien estat aïllades d'arrels. Concretament, s'ha observat que un 33% de les *P. fluorescens* aïllades d'arrels presentaven aquest gen. No s'ha detectat la presència del gen *HCN1* en cap soca de *P. chlororaphis* i *P. protegens* de la col·lecció del CIDSAV
4. En un principi, es van dissenyar dos parells d'encebadors per detectar la presència dels gens de producció de la toxina fit, ja que les seqüències del *fitD* entre *P. chlororaphis* i *P. protegens* no eren idèntiques. Però els resultats indiquen que els encebadors dissenyats per *P. chlororaphis* servien per detectar les dues seqüències del *fitD* disponibles al GenBank.
5. No s'ha detectat la presència del gen *fitD* en cap soca de *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* i *P. protegens* de la col·lecció del CIDSAV. En el cas de *P. fluorescens*, tot i que els encebadors van amplificar un fragment de mida similar, la seva seqüència no es corresponia al gen.

5. BIBLIOGRAFIA

- Alewu, B., & Nosiri, C. (2011). Pesticides and human health. In *Pesticides in the Modern World-Effects of Pesticides Exposure*. IntechOpen.
- Andersen, S. M., Johnsen, K., Sørensen, J., Nielsen, P., & Jacobsen, C. S. (2000). *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-1957>
- Andreolli, M., Zapparoli, G., Angelini, E., Lucchetta, G., Lampis, S., & Vallini, G. (2019). *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.003>
- Badosa, E. (2001). Anàlisi polifàsica de soques de *Pseudomonas fluorescens* potencials agents de biocontrol en malalties de fruiters. Tesis doctoral. Universitat de Girona.
- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., & van Loon, L. C. (2007). Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. . *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-2-0239>
- Blumer, C., & Haas, D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s002039900127>
- Bonaterra, A. (1997). Aïllament i caracterització de fitobacteris epífits antagonistes i control biològic de *Stemphylium vesicarium*. Tesis doctoral. Universitat de Girona.
- Brown, S. D., Utturkar, S. M., Klingeman, D. M., Johnson, C. M., Martin, S. L., Land, M. L., ... Pelletiera, D. A. (2012). Twenty-one genome sequences from pseudomonas species and 19 genome sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphere and endosphere of *Populus deltoides*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.01243-12>
- Campbell, R. E. (Richard E. (1989). *Biological control of microbial plant pathogens*. Cambridge University Press.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Devi, K. K., & Kothamasi, D. (2009). *Pseudomonas fluorescens* CHA0 can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by inhibiting cytochrome c oxidase of the termite respiratory chain. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1111/j.1574->

- Flury, P., Aellen, N., Ruffner, B., Péchy-Tarr, M., Fataar, S., Metla, Z., ... Maurhofer, M. (2016). Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: Phylogenetic distribution and comparative genomics. *ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.5>
- Flury, P., Vesga, P., Dominguez-Ferreras, A., Tinguely, C., Ullrich, C. I., Kleespies, R. G., ... Maurhofer, M. (2018). Persistence of root-colonizing *Pseudomonas protegens* in herbivorous insects throughout different developmental stages and dispersal to new host plants. *ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0317-4>
- Frapolli, M., Pothier, J. F., Défago, G., & Moëgne-Loccoz, Y. (2012). Evolutionary history of synthesis pathway genes for phloroglucinol and cyanide antimicrobials in plant-associated fluorescent pseudomonads. *Molecular phylogenetics and evolution*, 63(3), 877-890.
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- Garrido-Sanz, D., Arrebola, E., Martínez-Granero, F., García-Méndez, S., Muriel, C., Blanco-Romero, E., ... Redondo-Nieto, M. (2017). Classification of isolates from the *Pseudomonas fluorescens* complex into phylogenomic groups based in group-specific markers. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00413>
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., & Redondo-Nieto, M. (2016). Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150183>
- Gatehouse, A. M. R., Ferry, N., Edwards, M. G., & Bell, H. A. (2011). Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0330>
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214>
- Haas, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual review of phytopathology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656>
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., ... Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/10.1289/ehp.8051>
- Hirano, S. S. (2000). Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* — a Pathogen , Ice Nucleus , and Epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.
- Höfte, M., & Altier, N. (2010). Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for

sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.04.007>

Ingram, J. (2011). A food systems approach to researching food security and its interactions with global environmental change. *Food Security*, 3(4), 417-431.
<https://doi.org/10.1007/s12571-011-0149-9>

Kang, B. R., Yang, K. Y., Cho, B. H., Han, T. H., Kim, I. S., Lee, M. C., ... Kim, Y. C. (2006). Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase *gacS*. *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0427-x>

Keinan, A., & Clark, A. G. (2012). Recent explosive human population growth has resulted in an excess of rare genetic variants. *Science*, 336(6082), 740-743.
<https://doi.org/10.1126/science.1217283>

Kitahara, K., Yasutake, Y., & Miyazaki, K. (2012). Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19220-19225.

Kortenkamp, A. (2007). Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*.
<https://doi.org/10.1289/ehp.9357>

Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V, Davis, E. W., Lim, C. K., Shaffer, B. T., ... Paulsen, I. T. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS genetics*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002784>

Mercado-Blanco, J., & Bakker, P. A. H. M. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: Exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*.
<https://doi.org/10.1007/s10482-007-9167-1>

Miranda, C. D., & Zemelman, R. (2002). Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Science of the Total Environment*.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00022-0)

Mnif, W., Hassine, A. I. H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., & Roig, B. (2011). Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph8062265>

Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>

Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>

- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in public health*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
- Nougadère, A., Sirot, V., Kadar, A., Fastier, A., Truchot, E., Vergnet, C., ... Leblanc, J. C. (2012). Total diet study on pesticide residues in France: Levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environment International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.02.001>
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Péchy-Tarr, M., Borel, N., Kupferschmied, P., Turner, V., Binggeli, O., Radovanovic, D., ... Keel, C. (2013). Control and host-dependent activation of insect toxin expression in a root-associated biocontrol pseudomonad. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12050>
- Péchy-Tarr, M., Bruck, D. J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., Henkels, M. D., ... Keel, C. (2008). Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01662.x>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>
- Pérez, M. (2018). Classificació en grups filogenòmics d'aïllats de *Pseudomonas fluorescens* interessants pel seu ús en protecció de cultiu. Treball final de grau. Universitat de Girona.
- Raaijmakers, J. M., & Weller, D. M. (2001). Exploiting Genotypic Diversity of *Pseudomonas* spp. : Characterization of Exploiting Genotypic Diversity of 2, 4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas* spp. : Characterization of Superior. *Diversity*. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2545>
- Rainey, P. B., Brodey, C. L., & Johnstone, K. (1993). Identification of a gene cluster encoding three high-molecular-weight proteins, which is required for synthesis of tolaasin by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01608.x>
- Ramette, A., Frapolli, M., Saux, M. F. Le, Gruffaz, C., Meyer, J. M., Défago, G., ... Moënnelocoz, Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.005>
- Reiler, E., Jørs, E., Bælum, J., Huici, O., Alvarez Caero, M. M., & Cedergreen, N. (2015). The influence of tomato processing on residues of organochlorine and organophosphate insecticides and their associated dietary risk. *Science of the Total Environment*.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.081>

- Rijavec, T., & Lapanje, A. (2017). Cyanogenic *Pseudomonas* spp. strains are concentrated in the rhizosphere of alpine pioneer plants. *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.001>
- Ruffner, B., Péchy-Tarr, M., Ryffel, F., Hoegger, P., Obrist, C., Rindlisbacher, A., ... Maurhofer, M. (2013). Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02884.x>
- Scales, B. S., Erb-Downward, J. R., LiPuma, J. J., & Huffnagle, G. B. (2015). Draft Genome Sequences of Five *Pseudomonas fluorescens* Subclade I and II Strains, Isolated from Human Respiratory Samples. *Genome Announcements*. <https://doi.org/10.1128/genomea.00837-15>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-a1. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31: 425–448. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x. cetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J., & Doudoroff, M. (1966). The aerobic *pseudomonads* a taxonomic study. *Journal of general microbiology*.
- Svercel, M., Duffy, B., & Défago, G. (2007). PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus hcnAB in *Pseudomonas* spp. *Journal of microbiological methods*, 70(1), 209-213.
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- United Nations. (2017). World Population Prospects The 2017 Revision Key Findings and Advance Tables ESA/P/WP/248. *World Population Prospects The 2017 revision*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Vacheron, J., Péchy-Tarr, M., Brochet, S., Heiman, C. M., Stojiljkovic, M., Maurhofer, M., & Keel, C. (2019). T6SS contributes to gut microbiome invasion and killing of an herbivorous pest insect by plant-beneficial *Pseudomonas protegens*. *ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0353-8>
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA. *Annual Review of Phytopathology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>
- Vela, A. I., Gutiérrez, M. C., Falsen, E., Rollán, E., Simarro, I., García, P., ... Fernández-Garayzabal, J. F. (2006). *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64378-0>

- Wasi, S., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2013). Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: A review. *Environmental Monitoring and Assessment*. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3163-x>
- Witczak, A., & Abdel-Gawad, H. (2014). Assessment of health risk from organochlorine pesticides residues in high-fat spreadable foods produced in Poland. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.951574>
- Youard, Z. A., Wenner, N., & Reimann, C. (2011). Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in *Pseudomonas* species. *En BioMetals*. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9399-9>

6. ANNEX

Taula 6.1. Soques utilitzades en aquest treball cedides per altres investigadors i d'altres col·leccions.

Codi	Espècie	Procedència
BL915	<i>P. chlororaphis</i>	Steve Hill (Novartis Crop Protection, U.S.A.)
CECT 4470	<i>P. chlororaphis</i>	Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).
CHA0	<i>P. protegens</i>	Gènieve Défago (Institute of Plant Sciences, Switzerland)
Ps2-79	<i>P. fluorescens</i>	Linda Thomashow (U.S Department of Agricultural Research, U.S.A.)
Q ₄₋₈₇	<i>P. corrugata</i>	
SBW25	<i>P. fluorescens</i>	Mark J. Bailey (Institute of Virology and Environmental Microbiology, England)
WB1	<i>P. protegens</i>	Walid Fakhouri (Universität Hohenheim, Germany)
WB52	<i>P. protegens</i>	

Taula 6.2 Soques del CIVDSAV utilitzades en aquest treball.

Codi	Espècie hoste	Òrgan
200	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
201	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
202	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
203	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
204	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
205	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
206	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
207	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
208	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
209	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
210	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
211	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
212	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Arrel
213	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
215	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
216	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
218	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
219	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
220	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
221	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
222	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
223	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
224	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
225	<i>Anthylis montana</i>	Arrel
227	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
228	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
229	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
230	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
231	<i>Pyrus communis</i>	Arrel

Codi	Espècie hoste	Òrgan
232	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
233	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
234	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
236	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
237	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
238	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
239	<i>Pyrus communis</i>	Arrel
240	<i>Triticum aestivum</i>	Arrel
241	<i>Triticum aestivum</i>	Arrel
242	<i>Triticum aestivum</i>	Arrel
243	<i>Triticum aestivum</i>	Arrel
244	<i>Prunus spinosa</i>	Arrel
245	<i>Prunus spinosa</i>	Arrel
247	<i>Prunus spinosa</i>	Arrel
248	<i>Malus sp.</i>	Arrel
249	<i>Malus sp.</i>	Arrel
250	<i>Malus sp.</i>	Arrel
251	<i>Malus sp.</i>	Arrel
252	<i>Malus sp.</i>	Arrel
253	<i>Malus sp.</i>	Arrel
254	<i>Malus sp.</i>	Arrel
256	<i>Malus sp.</i>	Arrel
257	<i>Malus sp.</i>	Arrel
258	<i>Malus sp.</i>	Arrel
259	<i>Malus sp.</i>	Arrel
260	<i>Malus sp.</i>	Arrel
261	<i>Malus sp.</i>	Arrel
262	<i>Malus sp.</i>	Arrel
263	<i>Fagus sylvatica</i>	Arrel
264	<i>Fagus sylvatica</i>	Arrel
265	<i>Trifolium</i>	Arrel
266	<i>Fagus sylvatica</i>	Arrel
267	<i>Trifolium</i>	Arrel
268	<i>Trifolium</i>	Arrel
269	<i>Trifolium</i>	Arrel
270	<i>Carex</i>	Arrel
272	<i>Carex</i>	Arrel
273	<i>Carex</i>	Arrel
274	<i>Luzula</i>	Arrel
275	<i>Luzula</i>	Arrel
276	<i>Luzula</i>	Arrel
277	<i>Luzula</i>	Arrel
278	Papilionàcia	Arrel
279	Papilionàcia	Arrel
280	<i>Medicago sativa</i>	Arrel
281	<i>Medicago sativa</i>	Arrel
282	<i>Medicago sativa</i>	Arrel
283	<i>Medicago sativa</i>	Arrel
284	<i>Avena vulgare</i>	Arrel
285	<i>Avena vulgare</i>	Arrel
286	<i>Avena vulgare</i>	Arrel
287	<i>Avena vulgare</i>	Arrel
288	<i>Zea Mays</i>	Arrel

Codi	Espècie hoste	Òrgan
289	<i>Zea Mays</i>	Arrel
290	<i>Zea Mays</i>	Arrel
291	<i>Zea Mays</i>	Arrel
292	<i>Zea Mays</i>	Arrel
293	<i>Quercus ilex</i>	Arrel
294	<i>Quercus ilex</i>	Arrel
296	<i>Vitis Vitifera</i>	Arrel
297	Gramínia	Arrel
298	Gramínia	Arrel
299	Gramínia	Arrel
300	Gramínia	Arrel
301	Gramínia	Arrel
302	Gramínia	Arrel
303	<i>Sarotamnus</i>	Arrel
304	<i>Sarotamnus</i>	Arrel
305	<i>Sarotamnus</i>	Arrel
308	<i>Trigonella</i>	Arrel
309	<i>Trigonella</i>	Arrel
310	<i>Trigonella</i>	Arrel
312	<i>Trigonella</i>	Arrel
313	<i>Solanum lycopersicum</i>	Arrel
314	<i>Solanum lycopersicum</i>	Arrel
317	<i>Nicotiana tabacum</i>	Arrel
318	<i>Nicotiana tabacum</i>	Arrel
319	<i>Capsicum annum</i>	Arrel
323	<i>Helianthus annuus</i>	Arrel
324	<i>Helianthus annuus</i>	Arrel
326	<i>Lactuca sativa</i>	Arrel
327	<i>Lactuca sativa</i>	Arrel
328	<i>Lactuca sativa</i>	Arrel
329	<i>Medicago sativa</i>	Arrel
330	<i>Medicago sativa</i>	Arrel
331	<i>Medicago sativa</i>	Arrel
332	<i>Medicago sativa</i>	Arrel
333	<i>Medicago sativa</i>	Arrel
334	<i>Zea mays</i>	Arrel
335	<i>Zea mays</i>	Arrel
336	<i>Zea mays</i>	Arrel
337	<i>Zea mays</i>	Arrel
338	<i>Pyrus sp.</i>	Fulla
339	<i>Prunus sp.</i>	Borró
340	<i>Prunus sp.</i>	Borró
341	<i>Prunus sp.</i>	Tronc
343	<i>Prunus sp.</i>	Tronc
344	<i>Vitis vitifera</i>	Borró
345	ND	ND
346	ND	ND
347	<i>Pyrus sp.</i>	Borró
348	<i>Pyrus sp.</i>	Borró
349	<i>Pyrus sp.</i>	Borró
350	<i>Pyrus sp.</i>	ND
351	<i>Pyrus sp.</i>	ND
352	<i>Pyrus sp.</i>	Borró

Codi	Espècie hoste	Òrgan
353	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
354	<i>Vitis vitifera</i>	Borró
355	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
356	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
357	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
358	<i>Vitis vitifera</i>	Borró
359	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
360	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
361	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
362	ND	ND
363	ND	ND
364	<i>Vitis vitifera</i>	Borró
365	<i>Vitis vitifera</i>	Borró
366	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
367	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
368	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
369	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
370	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
371	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
372	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
373	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
374	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
375	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
376	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
377	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
378	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
379	<i>Veronica persica</i>	Flor
380	<i>Diplotaxis eruroides</i>	Flor
381	<i>Veronica persica</i>	Flor
382	<i>Prunus</i> sp.	Flor
383	<i>Veronica persica</i>	Flor
384	Gramínea	Fulla
385	<i>Veronica persica</i>	Flor
386	Gramínea	Fulla
404	Gramínea	Fulla
421	<i>Prunus</i> sp.	Borró
422	<i>Prunus</i> sp.	Borró
423	<i>Prunus</i> sp.	Borró
424	<i>Prunus spinosa</i>	Flor
462	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
464	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
465	<i>Cydonia oblonga</i>	Borró
529	<i>Prunus</i> sp.	Borró
530	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
531	<i>Prunus persica</i>	Flor
532	<i>Prunus persica</i>	Flor
533	<i>Pyrus</i> sp.	Borró
534	<i>Malus</i> sp.	Borró
535	<i>Prunus</i> sp.	Flor
537	<i>Pyrus communis</i> (General Leclerc)	Borró
538	<i>Pyrus communis</i>	Borró
539	<i>Pyrus communis</i> (General Leclerc)	Borró
550	<i>Prunus amygdalus</i>	Borró

Codi	Espècie hoste	Òrgan
555	ND	Nd
578	<i>Crataegus</i>	Flor
579	<i>Malus</i> sp.	Flor
580	<i>Pyrus comunis</i>	Flor
581	<i>Pyrus comunis</i>	Flor
582	<i>Malus</i> sp.	Fulla
583	<i>Crataegus</i>	Fulla
584	<i>Pyrus comunis</i>	Flor
585	<i>Pyrus comunis</i>	Flor
586	ND	Fulla
587	<i>Crataegus</i>	Flor
588	<i>Crataegus</i>	Flor
589	<i>Crataegus</i>	Flor
590	<i>Crataegus</i>	Fulla
591	<i>Pyrus comunis</i>	Fulla
597	<i>Crataegus</i>	Fulla
598	<i>Crataegus</i>	Fulla
599	<i>Crataegus</i>	Flor
600	<i>Pyrus communis</i>	Fulla
601	<i>Prunus</i> sp.	Fulla
602	<i>Crataegus</i>	Fulla
664A	<i>Prunus avium</i>	Fulla
684A	<i>Prunus domestica</i> X <i>Prunus persica</i>	Fulla
702A	<i>Prunus persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Fulla
720A	<i>P. persica</i> x <i>P. amygdalus</i>	Fulla
734A	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Arrel
735A	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Fulla
784A	Substrat	Substrat
795A	<i>P. persica</i> x <i>P. amygdalus</i>	Arrel
807A	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Arrel
808A	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Arrel
809A	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Arrel
810A	<i>Prunus domestica</i>	Fulla
811A	<i>Prunus domestica</i>	Arrel
812A	<i>Prunus domestica</i>	Arrel
813A	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Arrel
814A	<i>Prunus persica</i> x <i>P. davidiana</i>	Arrel
815A	<i>Prunus domestica</i>	Arrel
816A	<i>P. persica</i> x <i>P. belsiana</i> x <i>P. domestica</i>	Fulla
817A	<i>P. avium</i>	Arrel
818A	<i>P. persica</i> x <i>P. belsiana</i> x <i>P. domestica</i>	Fulla
894	<i>Malus domestica</i>	Fulla
895	<i>Malus domestica</i>	Fulla
945	<i>Malus domestica</i>	Fulla
2E	<i>Pyrus communis</i>	Fulla
16E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
17E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
23E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
26E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
27E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
45E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
50E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
53E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit

Codi	Espècie hoste	Òrgan
58E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
59E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
62E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
65E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
82E	<i>Pyrus communis</i>	Fulla
87E	<i>Pyrus communis</i>	Fulla
95E	ND	Fulla
102E	ND	Fulla
160E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
167E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
173E	<i>Pyrus communis</i>	Fruit
251E	<i>Pyrus malus</i>	Fulla
260E	<i>Vitis vinifera</i>	Fulla
268E	<i>Vitis vinifera</i>	Fulla
287E	<i>Prunus avium</i>	Fulla
300E	<i>Medicago sativa</i>	Fulla
309E	<i>Medicago sativa</i>	Fulla
315E	<i>Vitis vinifera</i>	Fulla
325E	<i>Vitis vinifera</i>	Fulla

*ND: no determinat