

Treball final de grau

Estudi: Grau en Innovació i Seguretat Alimentària

Títol: Activitat antimicrobiana de soques de *Pantoea spp.* enfront bacteris i fongs fitopatògens d'importància econòmica

Document: Memòria

Alumne: Eric Manzano Amir

Tutor: Anna Bonaterra Carreras

Departament: ENGINYERIA QUÍMICA, AGRÀRIA I TECNOLOGIA
AGROALIMENTÀRIA

Àrea: PRODUCCIÓ VEGETAL

Convocatòria (mes/any): 06/2021

Activitat antimicrobiana de soques de *Pantoea spp.* enfront bacteris i fongs fitopatògens d'importància econòmica

Treball final del Grau en Innovació i Seguretat Alimentària del Institut de Tecnologia
Agroalimentària (INTEA) de la Universitat de Girona.

Realitzat per Eric Manzano Amir en el grup d'investigació de Patologia vegetal del INTEA-
Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal (CIDSAV) sota la direcció de la Dra.
Anna Bonaterra i Esther Badosa.

Conforme,

Anna Bonaterra i Esther Badosa

Girona, Juny de 2021

Resum

Des de l'inici de l'agricultura en el període prehistòric del Neolític, els agricultors han hagut de combatre any rere any contra organismes nocius que produïen grans pèrdues econòmiques als conreus. Aquestes pèrdues tenen tendència a augmentar degut a la globalització i al canvi en les condicions climàtiques que faciliten l'aparició de malalties emergents i la seva ràpida dispersió.

Algunes de les malalties més destacades són produïdes per bacteris fitopatògens com *Erwinia amylovora* causant de la malaltia del foc bacterià en plantes de la família de les Rosàcies com el perer, *Pseudomonas syringae pv actinidiae* causant de la bacteriosi del kiwi, *Pseudomonas syringae pv. tomato* agent causal de la taca bacteriana del tomàquet i, *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria* per causar danys greus en cultius hortícoles i fruiters. Cal remarcar que els conreus també estan afectats per fongs que causen greus malalties. Per exemple *Fusarium oxysporum* i *Fusarium avenaceum*, són fongs que inclouen diferents patovars que poden provocar pèrdues econòmiques molt importants en alguns cultius com tomatera, meló, síndria o albergínia. *Botrytis cinerea* que causa la podridura gris en plantes com la vinya o les maduixeres i finalment *Penicillium expansum* causant de la podridura blava, malaltia més comuna i destructiva que afecta les pomes i peres en postcollita.

L'estratègia de maneig d'aquestes malalties al llarg de la història ha anat evolucionant gràcies a la millora tecnològica, centrada principalment en l'ús de plaguicides d'origen químic. En l'actualitat l'ús continuat i abusi dels plaguicides ha comportat diferents efectes negatius com el deteriorament del medi ambient a causa de l'acumulació de residus o l'aparició de resistències a aquests productes en els patògens. La societat, cada vegada més conscienciada pel deteriorament del medi ambient i exigent en la seguretat dels aliments ha provocat canvis legislatius que han establert mesures més restrictives amb la prohibició de diversos plaguicides de síntesi.

Aquesta situació porta a investigar sobre nous compostos que s'adeqüin al nou marc legislatiu Europeu, sostenibles, amb poc impacte negatiu en el medi ambient, efectius i que es puguin combinar amb una gestió integrada de maneig de malalties. Una de les alternatives són els bioplaguicides.

Els bioplaguicides són plaguicides d'origen natural que inclouen microorganismes beneficiosos (agents de biocontrol) o consistents en compostos actius obtinguts a partir

de microorganismes. Un tipus de compostos antimicrobians que es poden utilitzar pel desenvolupament de bioplaguicides i que es poden obtenir a partir de microorganismes són els pèptids. Algunes de les espècies bacterianes com *Lactobacillus* spp. *Bacillus* spp. *Pseudomonas* spp. o *Pantoea* tenen potencial de produir pèptids d'interès per ús en agricultura en la protecció de cultius. Entre ells hi ha les bacteriocines produïdes pels bacteris de l'àcid làctic (BAL), pèptids de baix pes molecular que presenten avantatges interessants com elevada activitat antimicrobiana o estimuladora de defenses.

Aquest estudi es centre en el gènere *Pantoea* spp. un grup de bacteris Gram-negatiu de la família de les Enterobacteriàcies, no esporulats, amb metabolisme fermentatiu, i amb soques que han estat descrites com a agents de biocontrol efectius enfront diverses malalties. Algunes d'aquestes soques produeixen pèptids antimicrobians descrits com la pantocina A i B, o bé altres soques de *P. agglomerans* que produeixen dapdiamidas (herbicòlines), compostos amb activitat antimicrobiana enfront bacteris i fongs.

Per aquest motiu el present treball té com a objectiu principal determinar l'activitat antimicrobiana enfront diferents bacteris i fongs fitopatògens de sobrenedants sense cèl·lules obtinguts de cultius de les soques del gènere *Pantoea* spp. Amb l'objectiu a llarg termini de desenvolupar un bioplaguicida pel maneig de malalties bacterianes i fúngiques.

En aquest estudi es van utilitzar 32 soques de *Pantoea* spp. seleccionades a partir d'un total de 214 aïllats de la col·lecció del grup de Patologia Vegetal-CIDSAV de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària de la UdG i 5 soques de referència de *Pantoea* que constitueixen ingredients actius de bioplaguicides comercials i/o que presenten gens relacionats amb la síntesi de bacteriocines. Per últim es va utilitzar una soca del gènere *Bacillus* com a soca de referència en els assajos amb fongs. Es va determinar l'activitat antibacteriana i antifúngica de les 37 soques utilitzant com a bacteris indicadors *Erwinia amylovora* PMV6076 (Ea), *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* IVIA 3700.1 (Psa), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst) i *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 206 (Xav). Amb relació als fongs indicadors, es van utilitzar *Fusarium oxysporum* ATCC 201829 (Fo), *Fusarium avenaceum* (PV-CIDSAV) (Fa), *Penicillium expansum* (EPS26 PV-CIDSAV) (Pe) i *Botrytis cinerea* ATCC33759B (Bc).

L'avaluació de l'activitat antimicrobiana en bacteris es va realitzar determinant la inhibició del creixement dels bacteris indicadors amb el mètode bioscreen. Es van realitzar diferents experiments amb el medi de cultiu GA i MM, i utilitzant diferents

concentracions de GA (2X, 4X, 6X i 10X) del suplement per determinar les millors condicions pel creixement del patogen. Els SSC de 14 soques de *Pantoea* presentaven més d'un 65% d'inhibició del creixement d'*E. amylovora* (EPS21, EPS396, EPS407, EPS412, EPS481, EPS490, EPS552, EPS553, EPS559, EM13cb, Va2197, Eh318, Eh-1087 i C9-1), 8 eren actives enfront *Pseudomonas syringae pv actinidiae* (EPS395, EPS396, EPS397, EPS399, EM13cb, Va2197, Eh318 i C9-1), 6 enfront *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria* (EPS396, EM13cb, Va2197, Eh318, Eh-1087 i C9-1) i 5 amb *Pseudomonas syringae pv. tomato* (EM13cb, Va2197, Eh318, Eh-1087 i C9-1). Les soques de referència Eh1087, Va2197, C9-1, Eh318 i EM13cb presentaven inhibició contra els 4 bacteris fitopatògens.

Pel que fa a l'activitat inhibidora de les soques de *Pantoea* enfront els diferents fongs indicadors es van realitzar diferents experiments per escollir el millor mètode. En el cas de Fa, Fo i Pe es van realitzar cultius dels fongs en una sobrecapa d'agar tou PDA i es van dipositar discos del cultiu de *Pantoea* realitzats en medi GA, de manera que el bacteri tingués contacte amb les cèl·lules del fong. En el cas de Bc es van realitzar cultius duals posant un disc de cultiu del fong al centre d'una placa de petri i els discos de medi sòlid amb les respectives soques bacterianes dipositats a la perifèria. Les soques de *Pantoea* no presentaven suficient activitat per inhibir els 4 fongs fitopatògens. Tot i que les soques EPS407, P10c, EM13cb i C9-1 frenaven el creixement del fong i tenien capacitat per créixer.

En conclusió algunes soques de *Pantoea* spp. com EPS21, EPS396, EPS397, EPS399, EPS412, EPS481, EPS551, EPS553 i EPS559, presenten característiques positives i poden ser candidates per la producció de bioplaguicides o formar compostos actius enfront *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*, *Pseudomonas syringae pv. tomato* i *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria*.

Agraïments

En aquest apartat voldria agrair a tota la gent que ha estat involucrada en aquest treball, ajudant-me i animant-me durant tot aquest període.

Per començar voldria donar les gràcies al grup de recerca en Patologia Vegetal-CIDSAV per incorporar-me al seu grup de treball i integrar-me en el món de la investigació i recerca.

Especialment voldria ressaltar la participació i ajuda de la Dra. Anna Bonaterra, Dra. Esther Badosa i Dr. Jesús Francès per ensenyar-me tot sobre els laboratoris, metodologies i sistemes per arribar a fer el treball i per ser un suport en tot el procés i ajudar-me a resoldre tots els dubtes i curiositats que em sorgien cada dia amb els seus consells.

També donar les gràcies als companys del laboratori, Dídac, Marçal i Lluís per fer els matins i tardes en el laboratori més amenes, pels bons moments i per l'ajuda que m'han proporcionat.

Al meu company de grau, Pep Marcó per la seva ajuda i suport durant tots aquests anys en la carrera.

Per finalitzar, voldria agrair i donar les gràcies a la meua família i a la gent més propera, per ser un suport incondicional i estar amb mi durant tots els moments bons i difícils, i sempre amb la mateixa il·lusió que jo, per aconseguir els objectius que em proposava.

Índex

1 INTRODUCCIÓ	1
1.1 MALALTIES BACTERIANES I FÚNGIQUES QUE AFECTEN ELS CONREUS.....	1
1.2 ESTRATÈGIA DE MANEIG DE LES MALALTIES	3
1.3 BIOPLAGUICIDES	4
1.3.1 El gènere <i>Pantoea spp.</i>	7
1.3.2 Pèptids antimicrobians produïts per <i>Pantoea spp.</i>	7
2. ANTECEDENTS	10
3. OBJECTIUS	11
4. MATERIALS I MÈTODES	11
4.1 SOQUES BACTERIANES I FÚNGIQUES	11
4.2 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTIBACTERIANA DE LES SOQUES	14
4.2.1 Obtenció del sobrenedant sense cèl·lules a partir de cultius.....	14
4.2.2 Avaluació de l'activitat antimicrobiana amb el mètode bioscreen	14
4.3 SELECCIÓ DEL MEDI DE CULTIU PER L'OBTENCIÓ DEL SSC I ÒPTIM CREIXEMENT DEL PATÒGEN INDICADOR.....	17
4.4 EFECTE DE L'ADICIÓ D'UN SUPLEMENT DE MEDI EN L'ACTIVITAT ANTIMICROBIANA DELS SSC	17
4.5 ACTIVITAT ANTIBACTERIANA DELS SSC OBTINGUTS DE LES SOQUES DE <i>PANTOEA</i> ENFRONT Ea, Psa, Pst i Xav.....	18
4.5.1 Anàlisi estadística.....	19
4.6 ACTIVITAT ANTIFÚNGICA DE LES SOQUES DE <i>PANTOEA</i> SELECCIONADES	19
4.6.1 Cultiu de fongs indicadors en sobrecapa.....	19
4.6.2 Testos de contacte per determinar l'activitat antagonista de cèl·lules i SSC de <i>Pantoea</i> enfront fongs	20

4.6.3 Determinació de l'activitat antifúngica de soques de <i>Pantoea</i>	20
5. RESULTATS	22
5.1 EFECTE DEL MEDI DE CULTIU EN L'ACTIVITAT ANTIMICROBIANA DEL SSC.....	22
5.2 EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DEL MEDI GA EN EL CREIXEMENT D' <i>E.amylovora</i>	23
5.3 ACTIVITAT ANTIBACTERIANA DEL SSC DE <i>Pantoea spp.</i>	26
5.4 INHIBICIÓ CÈL·LULA A CÈL·LULA ENFRONT FONGS FITOPATOGENS	30
6 DISCUSSIÓ.....	32
7 APLICABILITAT	36
8 CONCLUSIONS.....	37
9 BIBLIOGRAFIA	38
ANNEX I: PROCEDÈNCIA DE LES SOQUES EPS.....	41
ANNEX II: COMPOSICIÓ MEDIS DE CULTIU.....	46

Glossari

RB	Replica biològica
PV	Patovar
SCC	Sobrenedant sense cèl·lules
UFC	Unitats formadores de colònies
Psa	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>actinidiae</i>
Xav	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Ea	<i>Erwinia amylovora</i>
Fa	<i>Fusarium avenaceum</i>
Fo	<i>Fusarium oxysporum</i>
Pe	<i>Penicillium expansum</i>
Bc	<i>Botrytis cinerea</i>
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
UE	Unió Europea
PDA	Potato Dextrosa Agar
PDB	Potato Dextrosa Broth
LB	Luria Bertani
MM	Medi Mínim
NCBI	National Center for Biotechnology Information

1 INTRODUCCIÓ

1.1 MALALTIES BACTERIANES I FÚNGIQUES QUE AFECTEN ELS CONREUS

Des de l'inici de l'agricultura fa més de 10.000 anys, els productors han hagut de protegir els cultius de diferents tipus d'organismes nocius com plagues, patògens i males herbes que provoquen importants pèrdues econòmiques. Aquestes pèrdues han estat estimades en els 6 principals cultius (blat de moro, blat, arròs, soja, patata i cotó) en una disminució de la productivitat del 33%, 13% corresponent als patògens (fongs i bacteris) (Oerke, 2006). A més, en els darrers anys les malalties tenen tendència a augmentar degut a la globalització i al canvi en les condicions climàtiques que faciliten l'aparició de malalties emergents i la seva ràpida dispersió (Zhan *et al.*, 2015).

Pel que fa als bacteris fitopatògens, es poden destacar *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* per causar malalties greus en cultius hortícoles i de fruiters. Específicament, el bacteri gram negatiu *E. amylovora* (EPPO A2 list) és l'agent causal del foc bacterià. Aquesta malaltia afecta plantes de la família de les Rosàcies de gran importància econòmica com el pomer, el perer o el nesprer. En la Figura 1, es poden veure els símptomes típics d'aquesta malaltia els quals són l'ennegriment de branques i fulles que confereixen a la planta un aspecte de cremat (Palacio *et al.*, 2009).



Figura 1. Síntomes de la malaltia del foc bacterià en perer (Cambra Alvarez *et al.*, 2012)

Un altre patògen rellevant és el bacteri gramnegatiu *P. syringae* pv. *actinidiae* (EPPO A2 list). Aquest bacteri causa la bacteriosi del kiwi i provoca importants danys al fruit i a la planta. Els principals símptomes de la malaltia inclouen taques necròtiques fosques i

angulars, envoltades per un halo cloròtic a les fulles, i presència xancre i exsudats en els teixits llenyosos (Froud *et al.*, 2015). També tenen especial rellevància alguns bacteris fitopatògens que afecten conreus hortícoles com el tomàquet o el pebrot. Per exemple, el bacteri gram negatiu *P. syringae* pv. *tomato* és l'agent causal de la taca bacteriana del tomàquet. La seva simptomatologia són petites lesions necròtiques a les fulles, generalment envoltades per un halo cloròtic. En els fruits provoca petites pústules negres, elevades, circulars menors a 2 mm de diàmetre, a vegades amb un halo humit (Uppalapati, *et al.*, 2008). A més, el bacteri gramnegatiu *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (sin. *X. campestris* pv. *vesicatoria*) causa la taca bacteriana del tomàquet i del pebrot. La seva simptomatologia són petites taques angulars sobre les fulles que inicialment són aquoses, sovint envoltades amb un halo cloròtic i que finalment es tornen marronoses, es dessequen i desprenen provocant una aparença de cribat (Basim, *et al.*, 2004).

Els conreus també estan afectats per fongs que causen greus malalties. Per exemple *Fusarium oxysporum* i *Fusarium avenaceum*, són fongs que inclouen diferents patovars que poden provocar pèrdues econòmiques molt importants en alguns cultius com tomatera, meló, síndria o albergínia. La simptomatologia de la malaltia és diversa i depèn molt de la planta hoste, però generalment el fong causa esgrogueïment lent i progressiu de la planta, i finalment marcimient vascular, en alguns casos produeix putrefacció d'arrels, tiges, fruits i llavors (Rampersad, 2020). Un altre fong que afecta cultius d'importància econòmica és *Botrytis cinerea* que causa la podridura gris en plantes com la vinya o les maduixeres, com es pot veure en la Figura 2.



Figura 2. Podridura gris en raïm causada per *B.cinerea* (Murray *et al.*, 2019)

És un fong necrotròfic que pot afectar a més de 200 plantes hostes i que pot aparèixer en qualsevol fase del cicle del cultiu, afectant principalment els fruits, però també pot estar present en altres parts de la planta (Elad, *et al.*, 2004). Finalment, *Penicillium expansum* causa la podridura blava que és la malaltia més comuna i destructiva que afecta les pomes i peres en postcollita. Els símptomes de la malaltia són podridures toves de color marronós brillant que s'estenen ràpidament en la superfície i dins el fruit. A més, *P. expansum* produeix la toxina patulina en els fruits afectats la qual es pot trobar en derivats de la poma (Baert, *et al.*, 2007).

1.2 ESTRATÈGIA DE MANEIG DE LES MALALTIES

Al llarg de la història els agricultors han utilitzat diferents estratègies de maneig de les malalties per reduir la seva incidència en els cultius. A l'inici de l'agricultura hi havia una intervenció limitada i s'utilitzaven mètodes mecànics i culturals (rotacions, guarets,...), varietats de plantes resistents als patògens, i també en alguns casos es van produir els primers usos de plaguicides químics, com el cas de l'ús de compostos de sofre als anys 2500-1500 aC pels Xinesos i Sumeris (Oerke, 2006). Entre els anys 1940 i 1960 es va produir la Revolució Verda que va suposar una important millora tecnològica en l'agricultura i un augment del rendiment dels conreus. Aquesta millora va causar un increment i generalització de l'ús de plaguicides que va permetre controlar molt més eficientment les malalties. No obstant, l'ús continuat i abusi dels plaguicides ha comportat diferents efectes negatius com el deteriorament del medi ambient degut a l'acumulació de residus o l'aparició de resistències a aquests productes en els patògens (Tilman, 1999).

Aquests efectes negatius dels plaguicides han comportat un canvi de paradigma en la societat que actualment està més conscienciada pel deteriorament del medi ambient i és més exigent en la seguretat dels aliments (del Puerto Rodríguez *et al.*, 2014). Per aquest motiu, a nivell Europeu i estatal durant els darrers anys, s'ha adaptat la legislació per establir mesures que fomenten accions més respectuoses amb el medi ambient. S'ha modificat la regulació de l'ús de fitosanitaris per fer front a les problemàtiques en relació als plaguicides (Reglament (CE) n°1107/2009, relatiu a la comercialització de productes fitosanitaris, i la Directiva 2009/128/CE, per la qual s'estableix el marc d'actuació

comunitària per aconseguir un ús sostenible dels plaguicides). Aquests reglaments regulen els tipus de plaguicides que es poden utilitzar en l'àmbit Europeu, i el límit màxim de residus permès en els aliments. Estan recolzats pel Reglament (UE) 2017/625, relatiu als controls que cal realitzar per garantir l'aplicació de la legislació sobre aliments i pinsos, i de les normes sobre salut i benestar dels animals, sanitat vegetal i productes fitosanitaris, aportant una major vigilància, control i seguretat en els aliments.

Aquesta nova regulació té com a objectiu minimitzar els efectes secundaris indesitjables de l'ús de productes d'origen químic i dóna prioritat als mètodes ecològics segurs. El desplegament d'aquesta legislació ha comportat la revisió del llistat de substàncies químiques de síntesi autoritzades per a la seva utilització a la UE, provocant una reducció considerable de substàncies actives permeses. Per això, actualment es fa necessari desenvolupar i implementar estratègies alternatives als compostos químics que permetin aconseguir el maneig de les malalties de manera eficient i sostenible.

El maneig de les malalties és complex degut a la manca de mètodes de control eficaços i la poca disponibilitat de cultivars d'interès comercial resistents als patògens. Degut a les restriccions en la legislació fitosanitària a la UE hi ha molt pocs plaguicides autoritzats disponibles pel control de les malalties. En aquest context, la millor estratègia per mantenir el desenvolupament de les malalties en un nivell acceptable és la gestió integrada de totes les mesures disponibles que permetin evitar o reduir l'efecte negatiu dels patògens en les plantes. Aquesta situació porta a investigar sobre nous compostos que s'adeqüin al nou marc legislatiu Europeu, sostenibles, amb poc impacte negatiu en el medi ambient, efectius i que es puguin combinar amb una gestió integrada de maneig de malalties.

1.3 BIOPLAGUICIDES

Els bioplaguicides són plaguicides d'origen natural que inclouen microorganismes beneficiosos (agents de biocontrol) o els compostos derivats del seu metabolisme, així com productes naturals com extractes de plantes. Aquests productes constitueixen estratègies alternatives als compostos químics i presenten característiques molt interessants pel maneig integrat de les malalties, ja que són capaços d'inhibir els microorganismes perjudicials per a les plantes, minimitzant les pèrdues i danys generats pels patògens. Alguns agents de biocontrol tenen característiques ideals com un ampli

espectre d'acció contra diferents patògens, elevat potencial inhibitori que permet utilitzar dosis baixes per inhibir els patògens, baixa toxicitat per l'hoste, i no tenen uns requeriments nutricionals elevats pel que són capaços de colonitzar la planta i sobreviure-hi. La utilització de bioplaguicides pel maneig de les malalties està creixent, però només representen el 2,89% del mercat global en plaguicides, encara que s'espera una taxa de creixement anual aproximada del 2,3% els propers anys (Gupta, *et al.*, 2010).

Els bioplaguicides consistents en compostos actius obtinguts a partir de microorganismes tenen elevat potencial en el futur. Aquests compostos es poden obtenir d'una manera molt eficient a partir de processos de fermentació que es poden optimitzar per tal d'obtenir els compostos desitjats a partir de substrats de baix cost. Els productes avermectina i spinosad, produïts per *Streptomyces avermitilis*, i *Saccharopolyspora spinosa*, respectivament són els dos bioplaguicides més exitosos produïts a partir de fermentació sòlida i comercialitzats com a insecticides pel sector agrícola (Omarini *et al.*, 2020).

Un tipus de compostos antimicrobians que tenen bones expectatives pel desenvolupament de bioplaguicides i que es poden obtenir a partir de microorganismes són els pèptids. Aquests compostos presenten avantatges interessants com elevada activitat (antimicrobiana o estimuladora de defenses, entre altres), baixa toxicitat i elevada biodegradabilitat. D'acord amb aquestes propietats, els pèptids s'adeqüen a les exigències de la nova legislació d'ús sostenible de productes fitosanitaris (Montesinos, 2006). Algunes de les fonts de compostos peptídics que es podrien obtenir per fermentació podrien ser les espècies *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.* o *Pantoea spp.* Totes aquestes espècies tenen potencial de produir pèptids d'interès per ús en agricultura en la protecció de cultius. Entre ells hi ha les bacteriocines produïdes pels bacteris de l'àcid làctic (BAL) que han sigut objecte de molts estudis. Es tracta de pèptids o proteïnes de baix pes molecular (normalment 30-60 aminoàcids) i es classifiquen en tres grans grups: classe I o lantibiòtics, classe II, comprenen petits pèptids estables al tractament tèrmic com plantaricines, pediocines, leucocines i lactococines i classe III que inclouen pèptids de cadena llarga. Aquestes bacteriocines tenen tant activitat bactericida com a bacteriostàtica enfront espècies relacionades (sobretot bacteris Grampositius), però també enfront bacteris Gramnegatius i fongs. Un altre grup amb molt potencial el constitueixen els ciclolipopèptids produïts per *Bacillus spp.* classificats en tres famílies de lipopèptids, surfactines (i.e., halobacillina, pumilacidina i surfactina), iturines (bacilomicina D/F/L/Lc, iturina A/C, i micosubtilina), i fengicines (fengicina A/B/S).

Aquests compostos presenten activitat antimicrobiana (fengicines), a més d'activitat estimuladora de defenses en plantes (surfactines, fengicines i iturines). També, les bacteriocines produïdes per *Pantoea spp.* com les pantocines i herbicolines que presenten també activitat antimicrobiana.

Segons el Ministeri d'Agricultura hi ha 2062 productes fitosanitaris autoritzats a Espanya, dels quals només 37 contenen una substància activa bioplaguicida microbiana, en la Taula 1 es mostren aquests productes.

Taula 1: Productes fitosanitaris autoritzats a Espanya que contenen alguna substància activa bioplaguicida d'origen microbià. (Ministerio de Agricultura 2021)

Nom	Formula	Empresa
AQ-10	AMPELOMICES QUISQUALIS 58% (5 X 10E9 ESPORAS/G) [WG] P/P	AGRICHEM, S.A.
SERENADE AS	BACILLUS SUBTILIS 1,37% (1,7 X 10E10 CFU/G) [SC] P/V	BAYER CROPSCIENCE, S.L
SERENADE MAX	BACILLUS SUBTILIS 15,67% (5,13 X 10E10 CFU/G) [WP] P/P	BAYER CROPSCIENCE, S.L
BACTUR 2X	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	KENOGARD, S.A.
BACTUR 2X WG	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	KENOGARD, S.A.
BARRENEX	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	KENOGARD, S.A.
BAZTHU-32	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	KENOGARD, S.A.
BELTHIRUL	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	PROBELTE, S.A.
BELTHIRUL 16 SC	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	PROBELTE, S.A.
BELTHIRUL-PLUS	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) + TEBUFENOCIDA 18% [WP] P/P	PROBELTE, S.A.
BELTHIRUL-S	AZUFRE 60% + BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 1,43% (1X10E6 UI/G) [DP] P/P	PROBELTE, S.A.
BIOBIT 32	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
BIOBIT-XL	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 11,8% (11,8 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
BIOSCROP BT 16	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	PROBELTE, S.A.
BIOSCROP BT 32	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	PROBELTE, S.A.
CANIGO	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
DELFIN	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (KURSTAKI 30.36, CEPA SA-11; 32 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	mitsui agriscience
DIPEL DF	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
EPSILON	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	TOMCATO, S.A.
ESMALK	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
FLORBAC	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
FORAY 48 B	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 11,8% (11,8 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
GEODA	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	KENOGARD, S.A.
LEPIBACK	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	PROBELTE, S.A.
MERGER	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	DOW AGROSCIENCES IBERICA, S.A.
NOVODOR	BACILLUS THURINGIENSIS TENEBRIONIS 0,01% (0,01 MILL. DE UTBT/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
PRESA 16	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	INDUSTRIAS AFRASA, S.A
QUARK	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A
SEQURA	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A
SLOGAN	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	EXCLUSIVAS SARABIA, S.A.
TUREX	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 2,5% (25 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	mitsui agriscience
XENTARI GD	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
BASSI WP	BEAUVERIA BASSIANA 22% (4,4 X 10E10 CONIDIAS/G) [WP] P/P	COMERCIAL QUIMICA MASSÓ, S.A
NATURALIS-L	BEAUVERIA BASSIANA 2,3% (2,3 X 10E9 CONIDIAS VIABLES/ML) [OD] P/V	AGRICHEM, S.A
TUSAL	TRICHODERMA HARZIANUM 0,5% (1X10E8 UFC/G) + TRICHODERMA VIRIDE 0,5% (1X10E8 UFC/G) [WG] P/P	NEWBIOTECHNIC S.A. N.B.T
MYCOTAL	VERTICILLIUM LECANII 14,8% (1 X 10E10 ESPORAS/G) [WP] P/P	KOPPERT B.V.
SPEXIT	VIRUS DE LA POLIEDROSIS NUCLEAR DE SPODOPTERA EXIGUA 50% (3,75 X 10E12 OB/L) [SC] P/V	AGRICHEM, S.A

1.3.1 El gènere *Pantoea* spp.

Pantoea spp. és un grup de bacteris Gram-negatius de la família de les Enterobacteriàcies, no esporulats, amb metabolisme fermentatiu. Es troben en gran diversitat d'ambients des del sòl, aigua, plantes, i animals. *Pantoea* ha estat freqüentment aïllada d'espècies vegetals, ja que forma part de la microbiota epífita habitual, però també es troba en el sòl, sediments, ambients aquàtics i fins i tot en aïllats clínics. La versatilitat i tractabilitat genètica dels aïllats de *Pantoea* el converteix en un grup ideal per desenvolupar productes biotecnològics mèdics, agrícoles i mediambientals rellevants (Walterson, *et al.*, 2015).

Dues espècies de *Pantoea* spp. tenen soques que han estat descrites com a agents de biocontrol efectius enfront diverses malalties com el foc bacterià i diverses podridures causades per fongs en postcollita, pertanyen a les espècies de *Pantoea agglomerans* i *Pantoea vagans*. Hi ha dos bioplaguicides microbians registrats i comercialitzats a EEUU i Canadà que contenen soques de *Pantoea* com a ingredient actiu (BlightBan C9-1 i Bloomtime Biological) (Sundin, *et al.*, 2009).

La capacitat de biocontrol de malalties de les soques de *Pantoea* és deguda a varis mecanismes incloent la colonització competitiva, la producció d'antibiòtics i/o la inducció de defenses en l'hoste (Johnson i Stockwell 2000; Pusey 2011). Algunes soques han mostrat activitat antimicrobiana enfront un ampli rang de patògens, incloent bacteris, fongs, oomicets i nematodes, degut a la secreció de compostos antimicrobians com les pantocines, herbicolines, microcines i fenazines (Pusey *et al.*, 2011; Walterson i Stavrínides, 2015). Concretament, la soca C9-1 de *P. vagans* i la soca E325 de *P. agglomerans* produeixen els pèptids antimicrobians pantocina A i B, o bé altres soques de *P. agglomerans* produeixen dapdiamidas (herbicolines). Aquests compostos tenen activitat antimicrobiana enfront bacteris i fongs, interferint en les rutes de síntesi d'aminoàcids o en la formació de la paret cel·lular.

1.3.2 Pèptids antimicrobians produïts per *Pantoea* spp.

Pantocines A

La pantocina A és un tripèptid no ribosomal d'estructura semicíclica (Figura 3). Aquest pèptid inhibeix els enzims de les rutes biosintètiques dels aminoàcids histidina i arginina. Les soques de *Pantoea* que sintetitzen aquest compost presenten el gen *paaP* que codifica

pel precursor peptídic de la pantocina compost per 30 aminoàcids. A més, presenten l'operó *paaABC* compost pels gens *paaA*, *paaB* i *paaC* que codifiquen pels enzims necessaris per convertir el precursor en pantocina A. Més concretament, *paaC* codifica per una proteïna de transport i confereix immunitat al bacteri enfront la pantocina (Figura 4) (Wright, *et al.*, 2004).

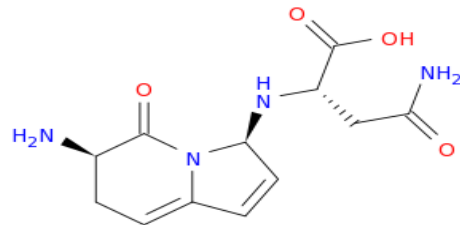


Figura 3. Estructura pantocina A (Mol-Instincts, 2018)

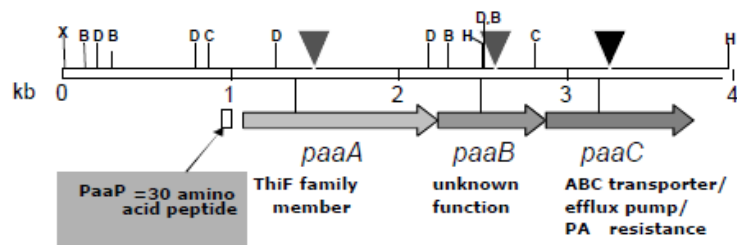


Figura 4. Organització dels gens que codifiquen els enzims de la pantocina A, l'operó *paa* (Wright, *et al.*, 2004)

Pantocines B

La pantocina B és un tripèptid lineal no ribosomal amb un grup metilsulfona en l'extrem C-terminal (Figura 5). Aquest pèptid interfereix la ruta de síntesi de l'arginina inhibint la síntesi de N-acetilornitina transaminasa. Els determinants de la biosíntesi de Pantocina B estan codificats pel clúster *pabB* a *pabM* (Brady, *et al.*, 1999).

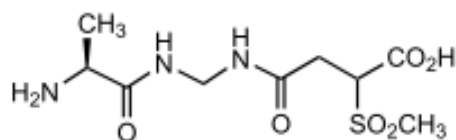


Figura 5. Estructura pantocina B (Mol-Instincts, 2018)

Dapdiamidas

Les dapdiamides són pèptids antimicrobians no ribosomals que es sintetitzen a partir d'un operó que té 9 gens (Figura 6). El procés de síntesi no està clar, ja que no es coneix l'ordre d'actuació de les proteïnes implicades, però sí que es sap que aquesta família de pèptids inhibeix la glucosamina-6-fosfat sintetasa de bacteris i fongs impedit el pas de fructosa-6-fosfat a glucosamina-6-fosfat, molècula relacionada amb la formació de la paret cel·lular (Kamber *et al.* 2012).

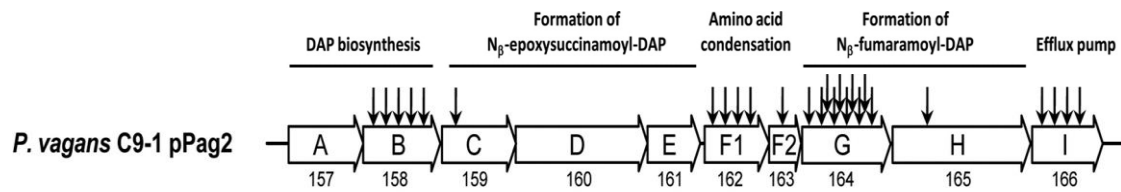


Figura 6. Operó de dapdiamidas de *P.vagans* C9-1 Font: (Kamber *et al.* 2012)

2. ANTECEDENTS

El grup de Patologia Vegetal-CIDSAV en el qual s'ha realitzat el present estudi, té una llarga trajectòria en l'àmbit de la recerca de la Patologia Vegetal i té com a objectiu principal desenvolupar estratègies innovadores i sostenibles de maneig integrat de malalties bacterianes i fúngiques que s'adeqüin a la nova legislació establerta. Més concretament, aquestes estratègies estan basades en el desenvolupament i aplicació de nous bioplaguicides de baixa toxicitat basats en microorganismes i pèptids funcionals.

Per aconseguir aquest objectiu, el grup disposa d'una àmplia col·lecció de soques bacterianes dels gèneres *Pseudomonas spp.*, *Pantoea spp.*, *Bacillus spp.* i bacteris de l'àcid làctic que tenen un enorme potencial per al desenvolupament de bioplaguicides microbians o l'obtenció de compostos antimicrobians per fermentació.

La col·lecció compta amb uns 200 aïllats de *Pantoea spp.* procedents de mostres de diversos fruiters. En estudis previs aquests aïllats es van caracteritzar pel que fa a l'activitat antimicrobiana *in vitro* enfront bacteris i fongs fitopatògens, l'eficàcia en el biocontrol de malalties i la presència de gens relacionats amb la síntesi de pèptids antimicrobians com les pantocines, les dapdiamides i la bacteriocina B. Concretament, es van obtenir 11 soques de *Pantoea spp.* que presentaven l'operó *paaABC* relacionat amb la síntesi de pantocina A i una soca que presentava els gens de síntesi de la bacteriocina B. Aquestes soques junt amb altres que havien mostrat activitat antimicrobiana o de biocontrol en estudis previs realitzats *in vitro* es varen escollir com a candidates per a futurs estudis.

3. OBJECTIUS

El present treball té com a objectiu principal determinar l'activitat antimicrobiana enfront diferents bacteris i fongs fitopatògens dels sobrenedants sense cèl·lules obtinguts de cultius de les soques del gènere *Pantoea spp.*

Amb l'objectiu a llarg termini de desenvolupar un bioplaguicida pel maneig de malalties bacterianes i fúngiques. Per aquest motiu els objectius concrets del present treball van ser:

- Establir una metodologia per determinar l'activitat antimicrobiana enfront bacteris i fongs fitopatògens de sobrenedants sense cèl·lules obtinguts de cultius de *Pantoea*.
- Seleccionar les soques de *Pantoea spp.* amb major activitat antimicrobiana enfront bacteris i fongs.

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1 SOQUES BACTERIANES I FÚNGIQUES

En aquest estudi es van utilitzar 32 soques de *Pantoea spp.* de la col·lecció del grup de Patologia Vegetal-CIDSAV de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària de la UdG. Aquestes soques es van seleccionar a partir d'un total de 214 aïllats de diferents procedències i espècies hostes. Estudis previs havien permès caracteritzar les soques pel que fa a la seva capacitat antimicrobiana enfront bacteris i fongs fitopatògens d'interès i/o presentar gens relacionats amb la síntesi de bacteriocines (Taula 2). A més, es van seleccionar 5 soques de referència de *Pantoea* que constitueixen ingredients actius de bioplaguicides comercials i/o que presenten gens relacionats amb la síntesi de bacteriocines (Taula 2). També es van seleccionar algunes soques que prèviament no havien presentat activitat antimicrobiana ni presència de gens de síntesi de bacteriocines com a controls negatius.

Les soques de *Pantoea spp.* utilitzades en aquest treball es mantenen crioconservades en medi LB amb glicerol al 20% a -80 °C (Ultra congelador MDF- U51865S, Sanyo, Tokio, Japó). Les soques es van recuperar realitzant sèbres en estria en plaques de medi Luria Bertani (LB) (Annex II) i incubant-les a 23 °C durant 24-48 h (Incubador UN-425-60E, Sanyo, Tokio, Japó).

Taula 2: Característiques de les soques de *Pantoea* utilitzades en aquest estudi.

Soca	Procedència		Activitat antimicrobiana		Presència de gens relacionats amb la síntesi de pèptids antimicrobians		
	Òrgan	Espècie	Bacteris	Fongs	PanA	Dap	Bac B
EPS21	Fruit	<i>Pyrus communis</i>	+	+	+	-	-
EPS125	Fruit	<i>Pyrus communis</i>	-	-	-	-	-
EPS388	Borró	<i>Pyrus communis</i>	-	-	-	-	-
EPS390	Fulla	Gramínia	-	+	-	-	-
EPS391	Flor	<i>Prunus amygdalus</i>	-	+	-	-	-
EPS392	Borró	<i>Pyrus communis</i>	-	+	-	-	-
EPS393	Borró	<i>Pyrus communis</i>	-	-	-	-	-
EPS394	Flor	<i>Prunus avium</i>	-	-	-	-	-
EPS395	Fulla	Gramínia	++	+	-	-	-
EPS396	Borró	<i>Pyrus communis</i>	+	-	-	-	-
EPS397	Borró	<i>Pyrus communis</i>	-	-	-	-	-
EPS399	Borró	<i>Pyrus communis</i>	+	-	-	-	-
EPS400	Borró	<i>Pyrus communis</i>	+	-	-	-	-
EPS401	Flor	<i>Prunus amygdalus</i>	+	-	-	-	-
EPS403	Borró	<i>Pyrus communis</i>	+	++	-	-	-
EPS406	Borró	<i>Pyrus communis</i>	-	-	-	-	-
EPS407	Borró	<i>Pyrus communis</i>	++	-	+	-	-
EPS408	Borró	<i>Pyrus communis</i>	-	-	-	-	-
EPS409	Borró	<i>Pyrus communis</i>	++	-	-	-	-
EPS411	Borró	<i>Malus domestica</i>	-	-	-	-	-
EPS412	Borró	<i>Malus domestica</i>	++	-	+	-	-
EPS413	Borró	<i>Pyrus communis</i>	+	-	-	-	-
EPS414	Borró	<i>Pyrus communis</i>	-	+	-	-	-
EPS481	Borró	<i>Malus domestica</i>	++	-	+	-	-
EPS490	Borró	<i>Prunus avium</i>	++	-	+	-	-
EPS551	Fulla	<i>Prunus amygdalus</i>	++	-	+	-	-
EPS552	Fulla	<i>Prunus amygdalus</i>	++	-	+	-	-
EPS553	Flor	<i>Prunus persica</i>	++	-	+	-	-
EPS554	Flor	<i>Prunus persica</i>	-	-	-	-	-
EPS557	Fulla	<i>Pyrus communis</i>	-	-	+	-	-
EPS559	Flor	<i>Prunus persica</i>	++	-	+	-	-
EM13cb	Sang	<i>Humana</i>	++	nd	-	-	+
Eh318*	Tija	<i>Malus domestica</i>	nd	nd	+	-	-
C9-1*	Fruit	<i>Malus domestica</i>	++	nd	+	+	-
Eh 1087*	Flor	<i>Malus domestica</i>	nd	nd	-	-	+
Va21971*	Ferida	<i>Humana</i>	++	nd	-	-	+
P10c*	Flor	<i>Malus domestica</i>	nd	nd	+	-	-

* soques de referència que constitueixen ingredients actius de bioplaguicides comercials i/o que presenten gens relacionats amb la síntesi de bacteriocines

Pel que fa als bacteris patògens indicadors, es va utilitzar *Erwinia amylovora* PMV6076 (Ea), *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* IVIA 3700.1 (Psa), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst) i *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 206 (Xav). Totes elles

es van mantenir conservades, sembrar i incubar de la mateixa manera que les soques de *Pantoea spp.*

La preparació de les suspensions dels bacteris indicadors es va realitzar utilitzant cultius en medi LB sòlid de 24 h per Ea, Psa i Pst i de 48 h per Xav. Després del període d'incubació, es va agafar una colònia del cultiu amb una nansa de Kolle i es va introduir en tubs de 5 ml de tampó fosfat (Annex II) fins assolir la concentració cel·lular idònia. Aquesta concentració es va determinar mitjançant la mesura de l'absorbància amb un espectrofotòmetre UV-VIS (Shimadzu UV-150A, Shimadzu Europa GMBH, Japó), ajustant les diferents suspensions a una absorbància a 600 nm de 0,15 per Ea, de 0,2 per Psa i Pst, i de 0,25 per Xav, que corresponien aproximadament a una concentració de bacteris de 10^8 UFC/ml. Per tal de confirmar aquesta concentració, en tots els experiments es van realitzar un banc de dilucions decimals successives de la suspensió, i es van sembrar 20 µl de les dilucions adequades en plaques d'agar LB que es van incubar 48 h a 23 °C. Un cop passat el període d'incubació es va fer el recompte de UFC en placa.

En relació als fongs, es van utilitzar *Fusarium oxysporum* ATCC 201829 (Fo), *Fusarium avenaceum* (PV-CIDSAV) (Fa), *Penicillium expansum* (EPS 26 PV-CIDSAV) (Pe) i *Botrytis cinerea* ATCC33759B (Bc) conservats en agar patata dextrosa (PDA) (Annex II) en tubs inclinats i emmagatzemats a 4°C. Per cultivar els fongs, es va dipositar un cub del cultiu del fong conservat en el vial, d'aproximadament 1 cm², en una placa d'agar PDA i es va incubar durant 7 dies a 23°C. A partir d'aquests cultius es van realitzar resembres periòdiques en medi PDA cada 7 dies.

Per a la preparació de les suspensions de conidis dels fongs es van utilitzar cultius en medi PDA de 7 dies. Es van abocar 5 ml d'aigua destil·lada estèril amb una gota de Tween 20 com a surfactant a l'interior de les plaques del cultiu dels fongs. La solució es va repartir damunt la superfície del cultiu del fong i amb l'ajut d'una nansa de Digralsky, es van resuspendre els conidis i es van recollir en un pot estèril. La suspensió es va filtrar a través d'un filtre miracloth que permetia separar les restes de miceli i obtenir solament els conidis. La concentració de conidis es va determinar mitjançant el microscopi amb l'ajut d'una càmera Thoma i es van realitzar dilucions de la suspensió original fins a ajustar-la a 10^4 conidis/ml.

4.2 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTIBACTERIANA DE LES SOQUES

4.2.1 Obtenció del sobrenedant sense cèl·lules a partir de cultius

Per obtenir els sobrenedants sense cèl·lules a partir de cultius de *Pantoea* es va començar realitzant un pre-cultiu en medi GA o MM líquid depenent de l'experiment (Annex II). A partir d'un cultiu de 48 h de les soques de *Pantoea* en medi agar LB es va carregar una nansa que es va introduir a l'interior d'un tub d'assaig amb 4,5 ml del medi líquid que es volia utilitzar. Els tubs es van incubar a 25 °C en agitació a 140 rpm (Agitador orbital, IKA K5501 Digital, IKA LABORTECHNIK, Staufen, Alemanya) durant 24 h.

Després de la incubació del pre-cultiu, es van afegir 0,5 ml del pre-cultiu en 4,5 ml del medi fresc corresponent i es van incubar a les mateixes condicions durant 72 h a 25 °C.

Un cop passat el període d'incubació, els cultius es van centrifugar a 10.000 rpm durant 15 min a 5 °C (Centrifuga 5415D, Eppendorf, Hamburg, Alemanya). Finalment, es va obtenir el sobrenedant i es va filtrar amb un filtre de 0,2 µm de diàmetre de porus (Whatman) i es va obtenir el sobrenedant sense cèl·lules (SSC) de les soques, tal com es mostra a la Figura 7.

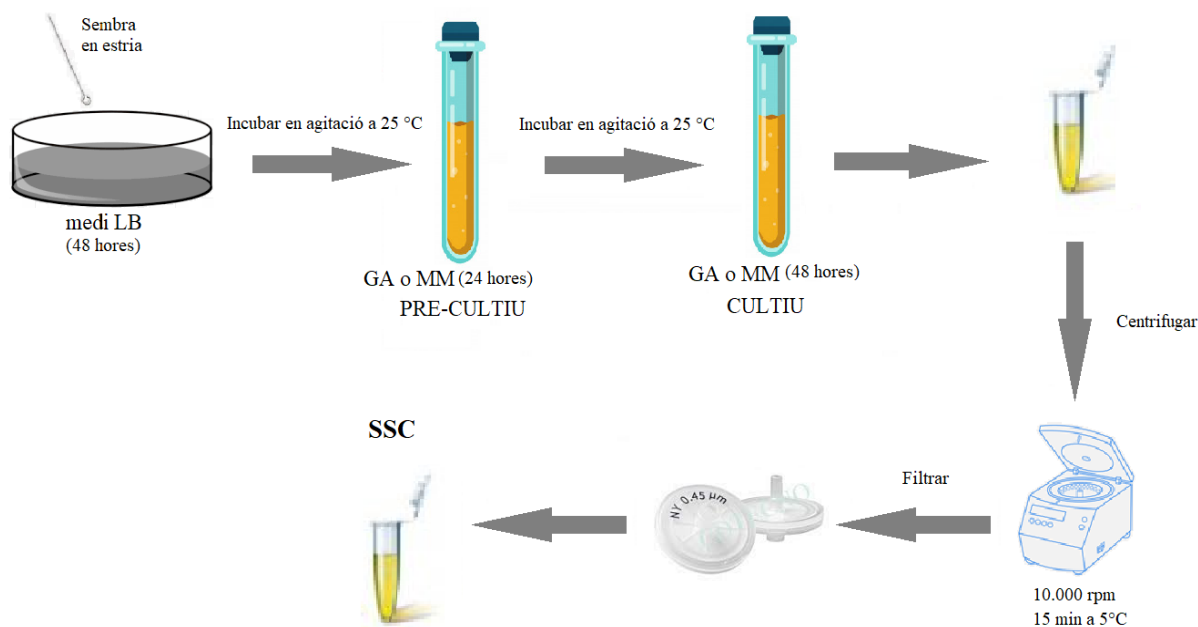


Figura 7. Obtenció dels sobrenedants sense cèl·lules (SSC) de *Pantoea* spp.

4.2.2 Avaluació de l'activitat antimicrobiana amb el mètode bioscreen

L'activitat antimicrobiana dels SSC obtinguts a partir dels cultius de *Pantoea* spp. enfront els 4 bacteris indicadors (Ea, Psa, Pst i Xav) es va determinar utilitzant el lector de plaques

Bioscreen (Bioscreen C, LabSystem, Helsinki, Finland). Aquest equip és un espectrofotòmetre programable que permet quantificar i fer el seguiment del creixement microbiològic dels diferents bacteris patògens indicadors a temps real mitjançant la mesura de la densitat òptica. En els diferents assajos es van utilitzar els SSC de les soques de *Pseudomonas* spp. que es van posar en contacte amb cèl·lules dels bacteris fitopatògens (Ea, Xav, Psa i Pto) amb l'objectiu de determinar la inhibició del seu creixement pels metabòlits presents als sobrenedants.

L'activitat inhibidòria dels SSC enfront els patògens indicadors es van determinar mitjançant una prova d'inhibició del creixement posant en contacte el SCC, el patogen i un suplement del medi a utilitzar per si s'havien esgotat els nutrients (la selecció del suplement s'explicarà en l'apartat 4.3). Per l'assaig, es van disposar 160 µl dels SSC en un pou d'una placa multipouet i es van barrejar (Figura 8) amb 20 µl de la suspensió del patogen indicador i 20 µl del suplement de medi adequat. Es van incloure dos tipus de controls positius introduint en els pouets: i) 160 µl del medi de cultiu, 20 µl de la suspensió del patogen i 20 µl d'aigua destil·lada, corresponent al control de creixement amb el medi o ii) 160 µl d'aigua, 20 µl de la suspensió del patogen i 20 µl del suplement de medi adequat. A més, es van incloure tres tipus de controls negatius introduint en cada pouet: i) 160 µl del SSC i 40 µl d'aigua, ii) 160 µl del medi de cultiu i 40 µl d'aigua destil·lada, o iii) 160 µl del medi de cultiu i 20 µl del suplement de medi adequat i 20 µl d'aigua. Cada un dels sobrenedant i controls es van realitzar per triplicat.

El creixement del bacteri indicador es va determinar mitjançant la mesura de la densitat òptica (DO) a 600 nm de les microplaques amb el lector de plaques Bioscreen que es van incubar durant 72 h a 25 °C amb 10 s d'agitació a intensitat mitjana abans de cada mesura. Amb els resultats de les DO, i després d'haver tret el soroll de fons de la lectura inicial, es va calcular l'àrea sota la corba que consistia en realitzar la integral de les àrees parcials de cada lectura. Es va confirmar el no creixement dels controls negatius i es va procedir a fer els càlculs per a cada un dels triplicats dels sobrenedants de cada soca. Un cop obtinguda l'àrea sota la corba (ASC) per cada triplicat es va calcular el percentatge d'inhibició de creixement respecte els controls positius (I). El càlcul de I es va realitzar utilitzant la següent fórmula: $I (\%) = 100 \times (ASC_{\text{control}} - ASC_{\text{SSC}}) / ASC_{\text{control}}$, essent ASC_{control} , la mitjana de l'àrea sota la corba obtinguda en els pous corresponents als controls positius de cadascun dels patògens i ASC_{SSC} , l'àrea sota la corba obtinguda en cada un dels pous amb SSC. Un cop obtingut per cada triplicat el percentatge d'inhibició

es procedia a realitzar la mitjana, calcular la desviació estàndard i l'interval de confiança per a cada combinació soca/patogen. L'experiment es va realitzar dues vegades.

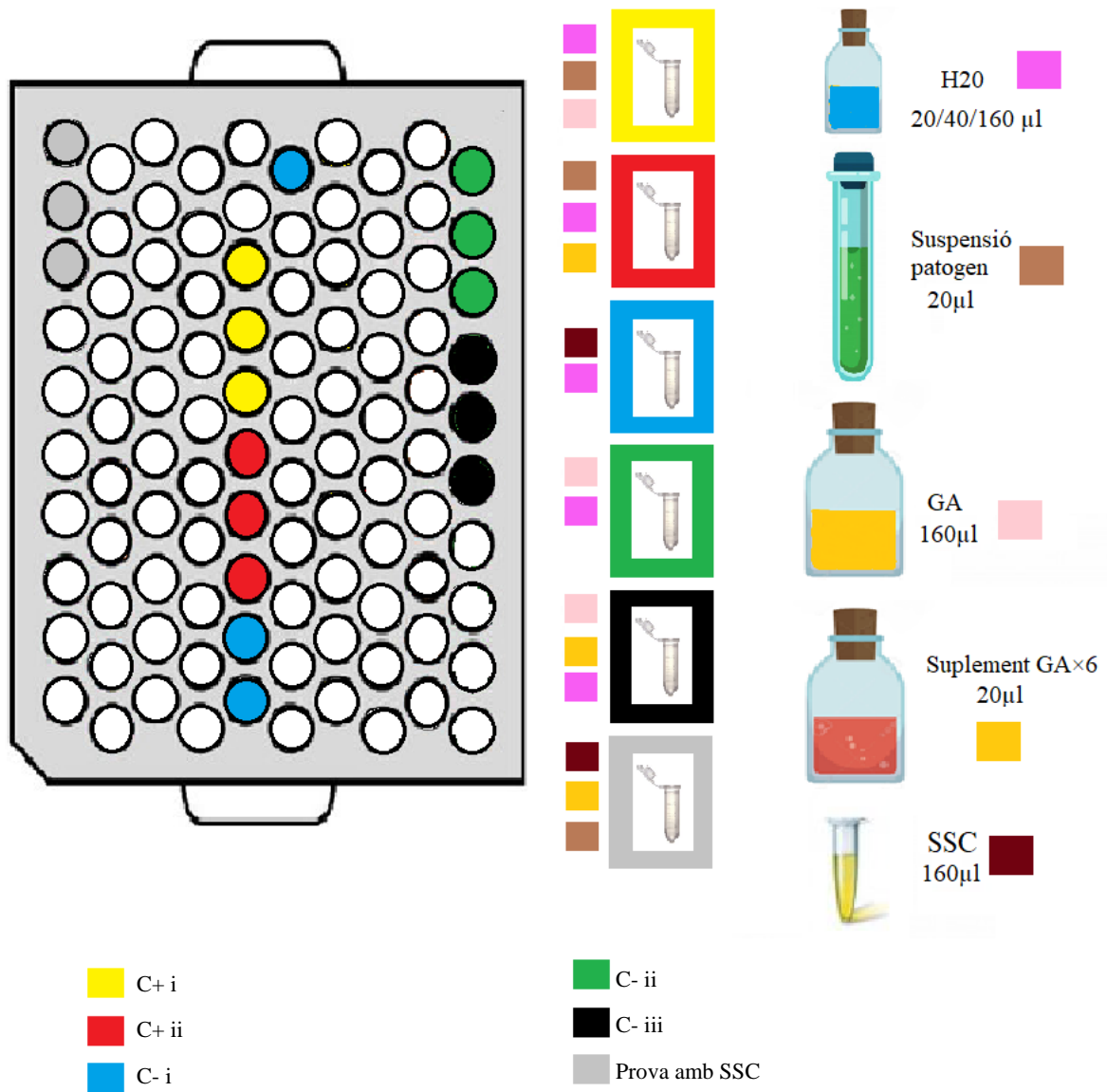


Figura 8. Exemple de preparació de la placa de Bioscreen per 14 soques de *Pantoea pp* amb 1 patogen

4.3 SELECCIÓ DEL MEDI DE CULTIU PER L'OBTENCIÓ DEL SSC I ÒPTIM CREIXEMENT DEL PATÒGEN INDICADOR

Inicialment, abans de l'establiment de les condicions de l'assaig per establir l'activitat dels SSC de les diferents soques, i amb l'objectiu d'escollir el medi de cultiu més adient per a l'obtenció dels SSC es va estudiar l'efecte del medi de cultiu en l'activitat antimicrobiana i en el creixement del patogen indicador. Es va realitzar un experiment obtenint SSC a partir de cultius de les soques de *Pantoea* EPS407, EPS557 i EPS559 en els medis GA i MM i determinant la seva activitat antimicrobiana enfront el bacteri indicador Ea. Per obtenir els SSC es van realitzar pre-cultius i cultius de les 3 soques de *Pantoea* en els medis MM i GA, tal com s'explica en l'apartat 4.2.1. Per determinar l'activitat antimicrobiana dels SSC obtinguts enfront Ea es van introduir a l'interior dels pous de la placa de bioscreen 180 µl del SSC i 20 µl del patogen indicador. A més es va realitzar un control positiu introduint 180 µl de MM o GA i 20 µl del patogen indicador, i finalment un control negatiu introduint 180 µl de SSC i 20 µl d'aigua destil·lada, i també un control negatiu corresponent al medi amb 180 µl i 20 µl d'aigua destil·lada. Es va determinar el percentatge d'inhibició dels SSC tal com s'explica en l'apartat anterior. El disseny experimental va consistir en 3 rèpliques per cada soca i medi. L'experiment es va realitzar dues vegades. L'activitat antimicrobiana dels SSC es va determinar calculant el percentatge d'inhibició del creixement del bacteri indicador utilitzant el mètode descrit en l'apartat 4.2.2.

4.4 EFECTE DE L'ADICIÓ D'UN SUPLEMENT DE MEDI EN L'ACTIVITAT ANTIMICROBIANA DELS SSC

Per posar de manifest que l'esgotament de nutrients en els SSC no era el motiu per impedir el creixement dels patògens indicadors, es van utilitzar diferents concentracions de suplement de GA que aportessin al patogen els nutrients suficients per créixer d'una manera correcta. Per aquest motiu es va estudiar l'efecte de l'addició de diferents concentracions de suplement de medi sobre el creixement dels patògens indicadors (Ea, Psa, Pst i Xav). El primer assaig es va realitzar introduint en un pou d'una placa de bioscreen 160 µl d'aigua destil·lada, 20 µl d'una suspensió del patogen indicador i 20 µl d'una solució a diferents concentracions de suplement de medi GA 2X, 4X, 6X i 10X (quedant la concentració final dins el pouet a 0,2X, 0,4X, 0,6X i 1X) en Ea i en la resta de patògens només concentracions de suplement de medi GA (4X, 6X i 10X). Com a control negatiu es van utilitzar 160 µl d'aigua destil·lada i 40 µl de suplement de medi

GA 10X. El disseny experimental va consistir en 5 rèpliques per cada concentració de suplement de medi i patògen. El creixement del bacteri indicador es va determinar mitjançant la mesura de la DO al llarg del temps en cadascun dels pous i el càlcul de l'àrea sota la corba tal com s'explica en l'apartat 4.2.2.

Posteriorment, per validar els resultats obtinguts en l'experiment realitzat anteriorment sobre la concentració de suplement de GA adient pel creixement dels patògens indicadors. Es va realitzar un segon assaig utilitzant SSC obtinguts a partir de les soques EPS407 (activa) i EPS557 (inactiva) en medi GA tal com s'ha explicat en l'apartat 4.2.1, per determinar el correcte creixement d'Ea utilitzant el SSC de les dues soques.

Es van disposar en un pou d'una placa de bioscreen 160 µl del SSC, 20 µl d'una suspensió d'Ea i 20 µl d'una solució a diferents concentracions de suplement de medi GA (0X, 2X, 4X, 6X i 10X). Es van incloure el control positiu que portava 160 µl d'aigua destil·lada, 20 µl d'una suspensió d'Ea i 20 µl de suplement de medi GA 10X i es van incloure els controls negatius amb 160 µl SSC i 40 µl d'aigua destil·lada. També corresponents als suplementes de medi GA es va posar un control negatiu amb 160 µl de suplement de medi GA 10X. El disseny experimental va consistir en 3 rèpliques per cada concentració de suplement de medi i soca. L'experiment es va repetir dues vegades. L'activitat antimicrobiana dels SSC es va determinar calculant el percentatge d'inhibició del creixement del bacteri indicador utilitzant el mètode descrit en l'apartat 4.2.2.

4.5 ACTIVITAT ANTIBACTERIANA DELS SSC OBTINGUTS DE LES SOQUES DE *PANTOEA* ENFRONT Ea, Psa, Pst i Xav

Per determinar l'activitat antibacteriana del SSC de *Pantoea* enfront Ea, Psa, Pst i Xav, es van utilitzar les 37 soques indicades en la taula 2. Els SSC de les soques de *Pantoea* seleccionades es van obtenir a partir de cultius realitzats en els medis GA tal com indica l'apartat 4.2.1.

L'activitat antimicrobiana dels SSC enfront Ea, Psa, Pst i Xav es va realitzar determinant la capacitat d'inhibició del creixement del patògen dels SSC. En l'apartat 4.3 es va determinar que el medi més adient per obtenir el SSC era el medi GA i tal com s'ha descrit en l'apartat 4.4, el suplement seleccionat va ser el medi GA 6X (quedant la concentració final dins el pouet a 0.6X). Es van dipositar 160 µl del SSC en un pou d'una placa de bioscreen que es van barrejar amb 20 µl d'una suspensió dels patògens indicadors i 20 µl de suplement de medi GA 6X. Es va afegir controls negatius que van consistir en 160 µl

del SSC i 40 µl d'aigua, 180 µl d'aigua amb 20 µl del suplement GA 6X i finalment un control que contenia 160 µl del medi de cultiu i 40 µl d'aigua destil·lada. També, es van incloure dos controls positius que va consistir en 160 µl del medi + 20 µl d'una suspensió del patogen indicador i 20 µl d'aigua destil·lada i un segon que va consistir amb 160 µl d'aigua, 20 µl del suplement de GA 6X i 20 µl del patogen. El disseny experimental va consistir en 3 rèpliques per cada soca de *Pantoea*. L'experiment es va repetir dues vegades. L'activitat antimicrobiana dels SSC es va determinar calculant el percentatge d'inhibició del creixement del bacteri indicador utilitzant el mètode descrit en l'apartat 4.2.2.

4.5.1 Anàlisi estadística

L'efecte dels SSC obtinguts dels cultius de soques de *Pantoea* en la inhibició del creixement dels bacteris indicadors es va determinar utilitzant l'anàlisi de la variància (ANOVA) amb el procediment GLM del paquet d'aplicacions estadístiques SAS (versió 9.1, SAS Institute Inc, EUA). La separació de mitjanes es va realitzar utilitzant la prova de Tukey ($P < 0,05$) del mateix paquet d'aplicacions.

4.6 ACTIVITAT ANTIFÚNGICA DE LES SOQUES DE *PANTOEA* SELECCIONADES

Es va optimitzar la metodologia per a la determinació de l'activitat antifúngica de les soques de *Pantoea spp.* enfront Fo, Fa, Pe i Bc.

4.6.1 Cultiu de fongs indicadors en sobrecapa

Es van utilitzar cultius de 3 fongs Fo, Pe i Bc en medi PDA incubats durant 7 dies a 20 °C. A continuació, es van obtenir suspensions de 10^4 , 10^5 i 10^6 conidis/ml dels diferents fongs tal com s'explica en l'apartat 4.1. Aquestes suspensions es van sembrar en sobrecapa en medi GA o PDA tou (el mateix medi però amb diferent quantitat d'agar). Per a la preparació de les sobrecapes, en el cas del medi GA es van utilitzar tubs amb 4,5 ml d'agar GA 7% fos (mantinguts a 45 °C fins la seva utilització) que es van suplementar amb 0,5 ml del suplement de GA×6 i 0,1 ml de la suspensió del fong a la concentració desitjada. Mentre que en el cas del medi PDA, es van utilitzar tubs amb 5 ml d'agar PDA 10% fos (mantinguts a 45 °C fins la seva utilització) que es van barrejar amb 0,1 ml de la suspensió del fong. Finalment, s'abocava el tub homogèniament en una placa de petri del mateix medi que la sobrecapa. Es van realitzar 3 rèpliques per cadascun dels fongs, medis i concentracions estudiades. Finalment, els cultius es van incubar a 20 °C durant 7 dies. Passat aquest període, es va observar el creixement dels fongs en els diferents medis.

4.6.2 Testos de contacte per determinar l'activitat antagonista de cèl·lules i SSC de *Pantoea* enfront fongs

Per escollir el millor mètode per a realitzar l'assaig de determinació de la inhibició dels fongs per part de les soques de *Pantoea spp.* es van utilitzar les soques EPS21, EPS396, EPS397 juntament amb el bacteri del gènere *Bacillus spp.* per veure quin era el millor dels 4 mètodes escollits per determinar l'activitat antagonista de cèl·lules i SSC enfront Fa, Fo, Pe i Bc.

Els dos primers mètodes es van realitzar utilitzant cultius dels 4 fongs patògens i obtenint suspensions de conidis a una concentració de 10^4 conidis per mil·lilitre tal com s'indica en l'apartat 4.1. Les suspensions ens van sembrar en sobrecapa en medi PDA utilitzant tubs amb 5 ml d'agar PDA 10% fos (mantinguts a 45 °C fins la seva utilització) el qual es va barrejar amb 0,1 ml de la suspensió del fong i s'abocava el tub homogèniament en una placa de petri del mateix medi que la sobrecapa. Un cop solidificada la sobrecapa es dipositaven discos procedents d'un cultiu dels bacteris de cada soca realitzat en medi GA (obtinguts amb la part ample de puntes de pipetes estèrils) que es dipositaven de manera que el bacteri tingués contacte amb les cèl·lules del fong, o per altra banda es dipositava una gota de 20 µl de SSC de les soques obtingudes mitjançant el procediment de l'apartat 4.2.1.

Els dos mètodes restants es van realitzar utilitzant discos (obtinguts amb la part ample de puntes de pipetes estèrils) procedents de cultius dels fongs patògens incubats en plaques de PDA durant 7 dies a 20°C, els quals es van dipositar al centre d'una placa de medi PDA. A continuació, es van dipositar una gota de 20 µl dels SSC o els discos dels cultius dels bacteris en medi GA obtinguts de la mateixa manera que els dos primers mètodes. El disseny experimental va consistir en dues rèpliques per cada soca i mètode. L'activitat antagonista de cèl·lules i SSC es va determinar mesurant el diàmetre d'halo d'inhibició.

4.6.3 Determinació de l'activitat antifúngica de soques de *Pantoea*

Per determinar l'activitat antifúngica de les soques de *Pantoea* enfront Fa, Fo, Pe i Bc, es van utilitzar les 37 soques indicades en la taula 2 i es va incloure com a control de referència una soca del gènere *Bacillus*.

Per sembrar els fongs Fa, Fo i Pe es van preparar unes suspensions de conidis i es va realitzar la sembra en una sobrecapa amb 4.5 ml d'agar tou PDA (10 g agar/l) a 45°C on

s'afegien 0.1 ml de la suspensió del fong a una concentració de 10^4 conidis/ml, s'homogeneïtzava el tub i es repartia com a sobrecapa en una placa de PDA. Un cop solidificada la sobrecapa es dipositaven discos procedents d'un cultiu homogeni en superfície de 72 h dels bacteris realitzat en medi GA (obtinguts amb la part ample de puntes de pipetes estèrils) que es dipositaven de manera que el bacteri tingués contacte amb les cèl·lules del fong. Per altra banda, amb Bc es van realitzar cultius duals posant un disc d'un cultiu de Bc en medi PDA de 7 dies al centre i els discos procedents de cultius de les soques bacterianes en GA de 72h dipositats com en la resta de fongs. El disseny experimental va consistir en dues rèpliques per soca per cada patogen. L'activitat antagonista de les cèl·lules es va determinar mesurant el diàmetre d'halo en mm d'inhibició respecte el fong patogen indicador. Un diàmetre d'inhibició superior a 25 mm es va indicar amb el símbol: +++, entre 25 i 15 mm es va indicar amb el símbol: ++, inferior a 15 mm es va indicar amb el símbol: +, i finalment l'absència d'halo d'inhibició amb el símbol:---.

5. RESULTATS

5.1 EFECTE DEL MEDI DE CULTIU EN L'ACTIVITAT ANTIMICROBIANA DEL SSC

En la Figura 9 i 10 es mostra el percentatge d'inhibició enfront Ea dels SSC obtinguts dels cultius de 3 soques del gènere *Pantoea* realitzats en dos medis diferents. Aquest experiment es va realitzar per escollir el medi de cultiu òptim per obtenir els SSC amb activitat antimicrobiana i que permetés un òptim creixement d'*E. amylovora*. A les Figures 9 i 10 es pot observar que els SSC obtinguts de les soques EPS407 i EPS559 presenten activitat inhibidòria elevada enfront Ea en els dos medis, mentre que els SSC obtinguts de la soca EPS557 presenten una activitat significativament inferior en els dos medis. Pel que fa als medis de cultiu utilitzats per l'obtenció dels SSC de les soques EPS407 i EPS559 en els dos casos s'observa una inhibició del creixement d'Ea superior al 95%. Finalment, el creixement d'Ea (obtingut en els controls positius) és més elevat en medi GA que en medi MM. L'àrea sota la corba obtinguts en els controls positius pel creixement d'Ea, calculat tal com s'indica en l'apartat 4.2.2, és de 8,728 en medi GA mentre que en MM és de 3,825.

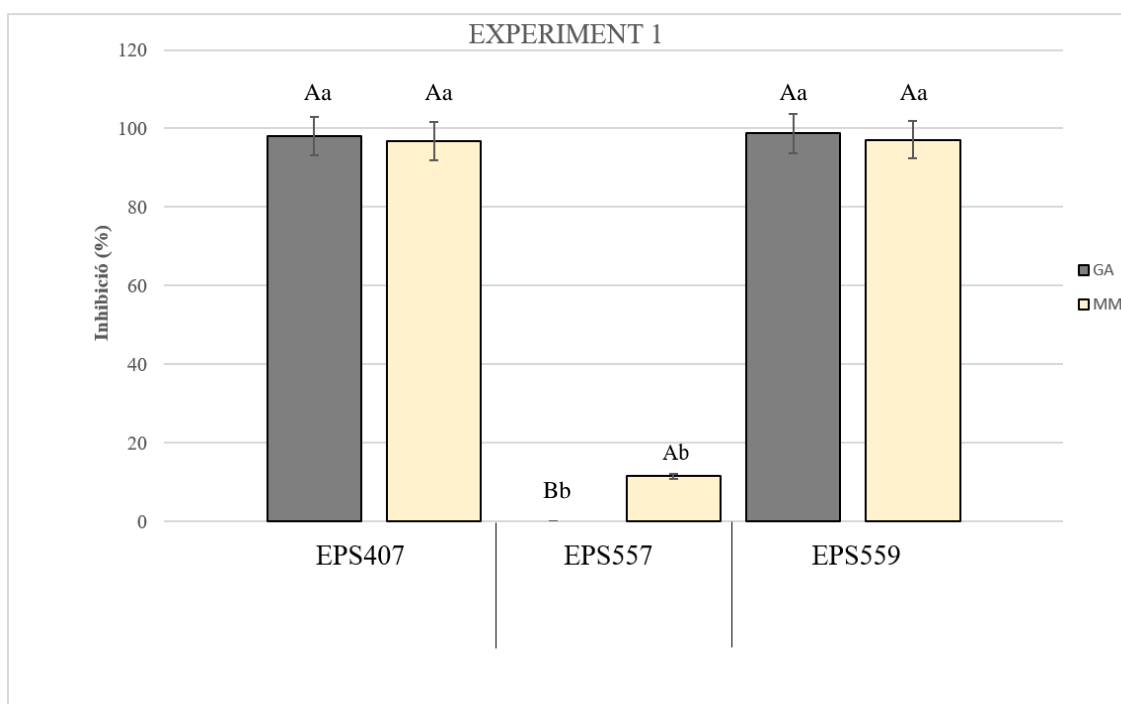


Figura 9. Efecte de la soca (EPS407, EPS557 i EPS559) i del medi de cultiu (GA i MM) utilitzat per la obtenció dels SSC en la inhibició del creixement d'Ea. Els intervals de confiança de les mitjanes s'indiquen en les barres. Les lletres diferents (majúscules per medis i minúscules per soca) indiquen diferències significatives entre tractaments segons el test de Tukey ($P < 0.005$).

Entre els dos experiments no es van observar diferències significatives en relació al percentatge d'inhibició d'Ea.

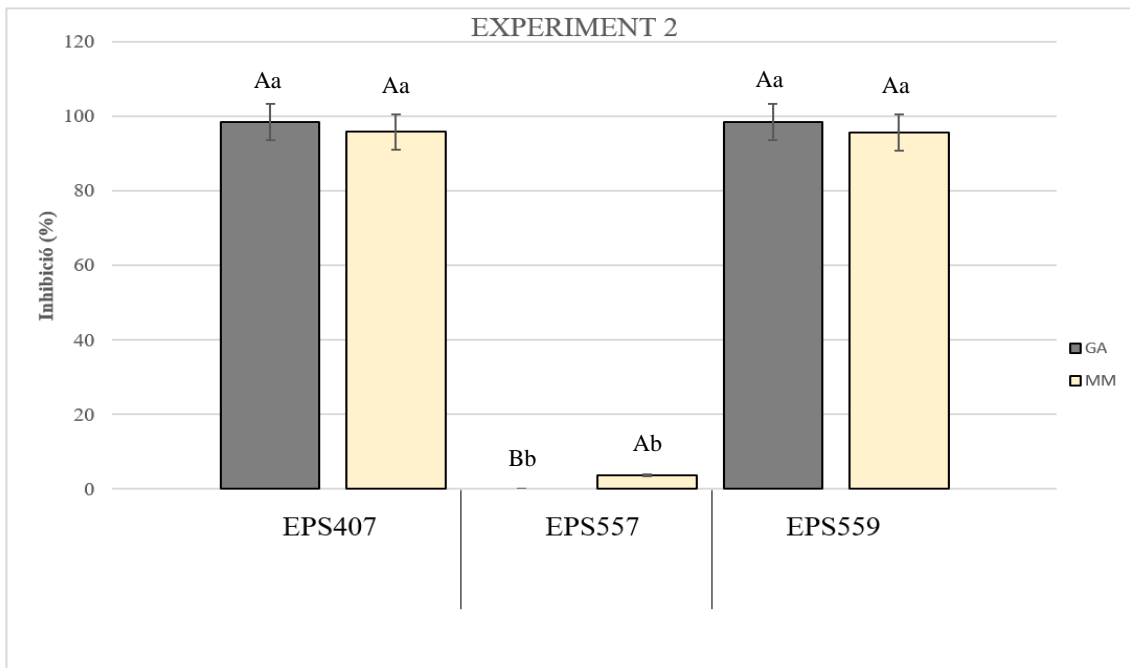


Figura 10. Efecte de la soca (EPS407, EPS557 i EPS559) i del medi de cultiu (GA i MM) utilitzat per la obtenció dels SSC en la inhibició del creixement d'Ea. Els intervals de confiança de les mitjanes s'indiquen en les barres. Les lletres diferents (majúscules per medis i minúscules per soca) indiquen diferències significatives tractaments entre segons el test de Tukey (P<0.005).

5.2 EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DEL MEDI GA EN EL CREIXEMENT D'*E. amylovora*

Amb la finalitat d'establir les concentracions de suplement de GA per obtenir un creixement òptim dels diferents patògens indicadors, es van realitzar els experiments que es mostren en les Figures 11, 12, 13 i 14.

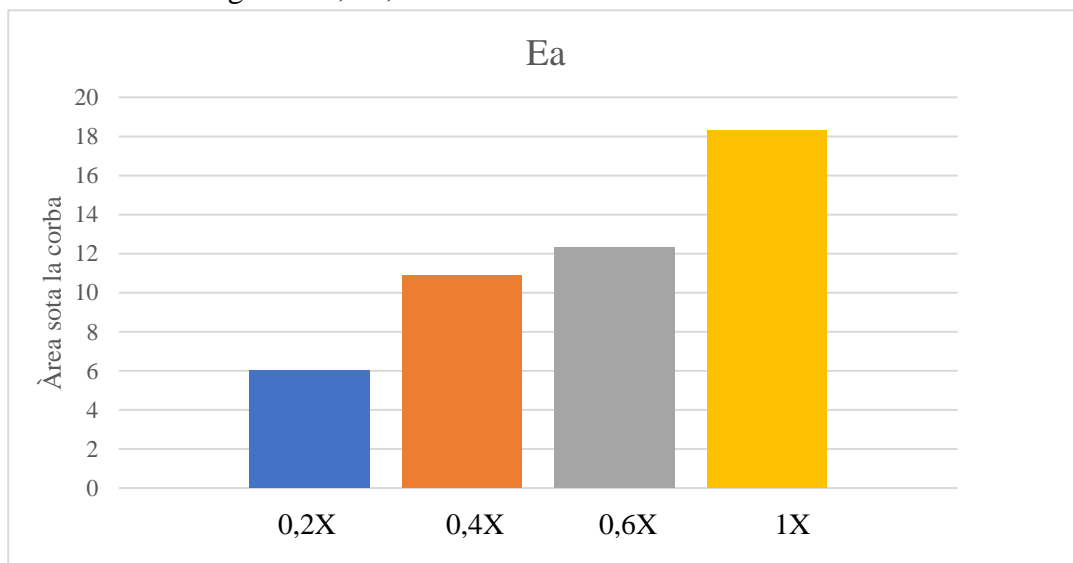


Figura 11. Efecte de la concentració del suplement del medi GA en el creixement d'*E. amylovora*

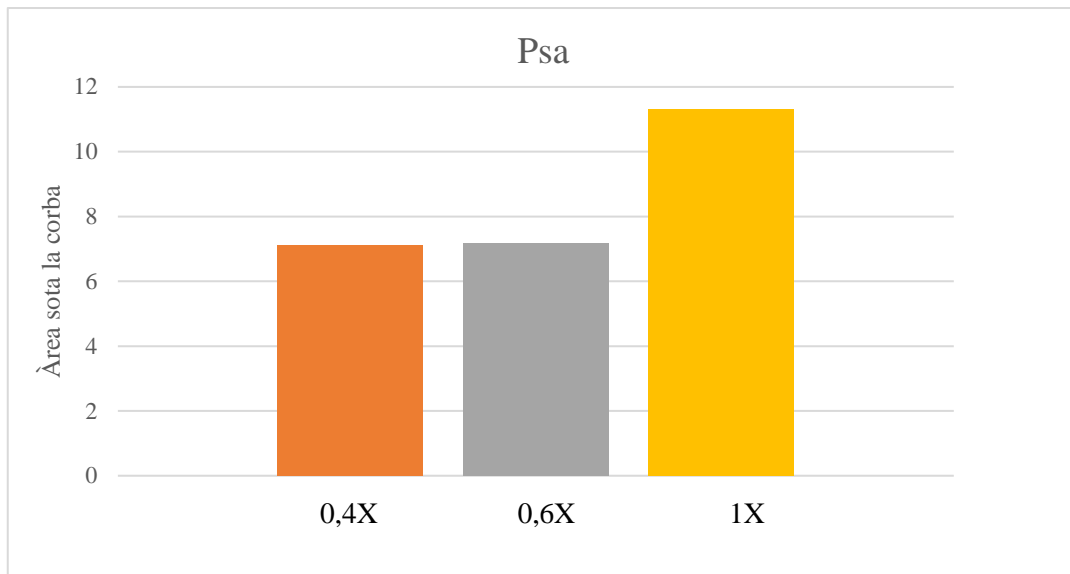


Figura 12. Efecte de la concentració del suplement del medi GA en el creixement de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

En la Figura 11 s'observa que a mesura que augmenta la concentració de suplement de GA, l'àrea sota la corba i per tant el creixement d'Ea també augmenta. Utilitzant les concentracions de suplement de 0,4X i 0,6X s'aconsegueix un correcte creixement del patogen indicador. Per altra banda, el suplement 0,2X no proporciona els nutrients necessaris perquè el seu creixement sigui òptim.

En les Figures 12, 13 i 14 es pot observar l'efecte de la concentració de suplement en el creixement de Psa, Pst i Xav, respectivament. En tots aquests experiments també s'aconsegueix un creixement òptim del patogen indicador amb concentracions de suplement de 0,4X i 0,6X.

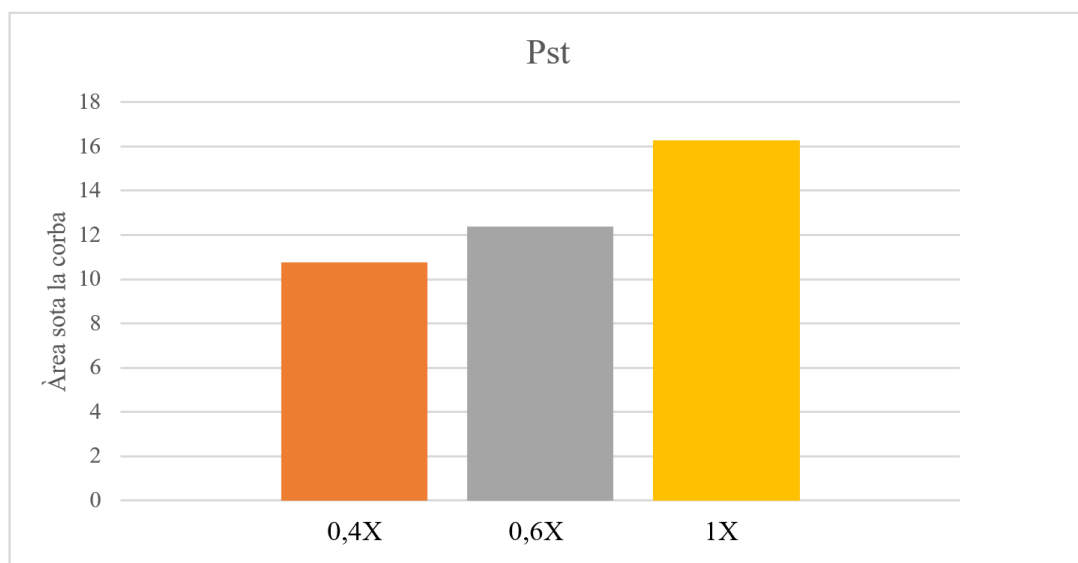


Figura 13. Efecte de la concentració del suplement del medi GA en el creixement de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

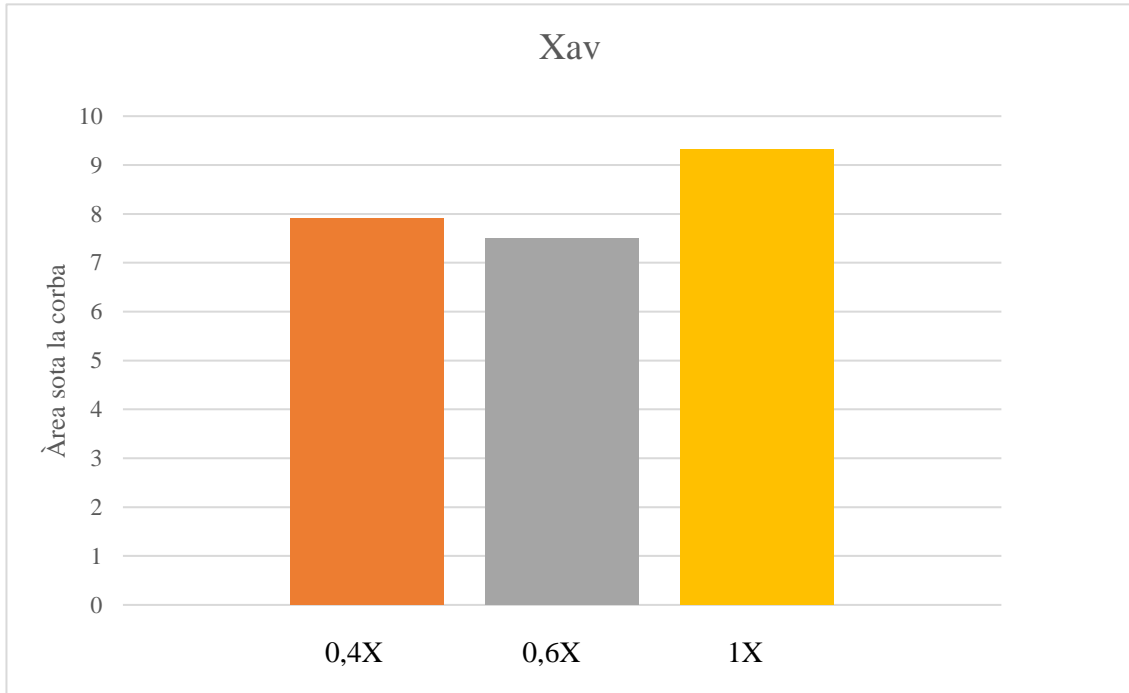


Figura 14. Efecte de la concentració del suplement del medi GA en el creixement de *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria*

En un segon assaig es va determinar l'efecte de la concentració de suplement de GA en la inhibició del creixement d'Ea, utilitzant els SSC obtinguts a partir de cultius de les soques EPS407 (activa) i EPS557 (inactiva) en GA. En la figura 15 i 16 es mostren els resultats dels dos experiments.

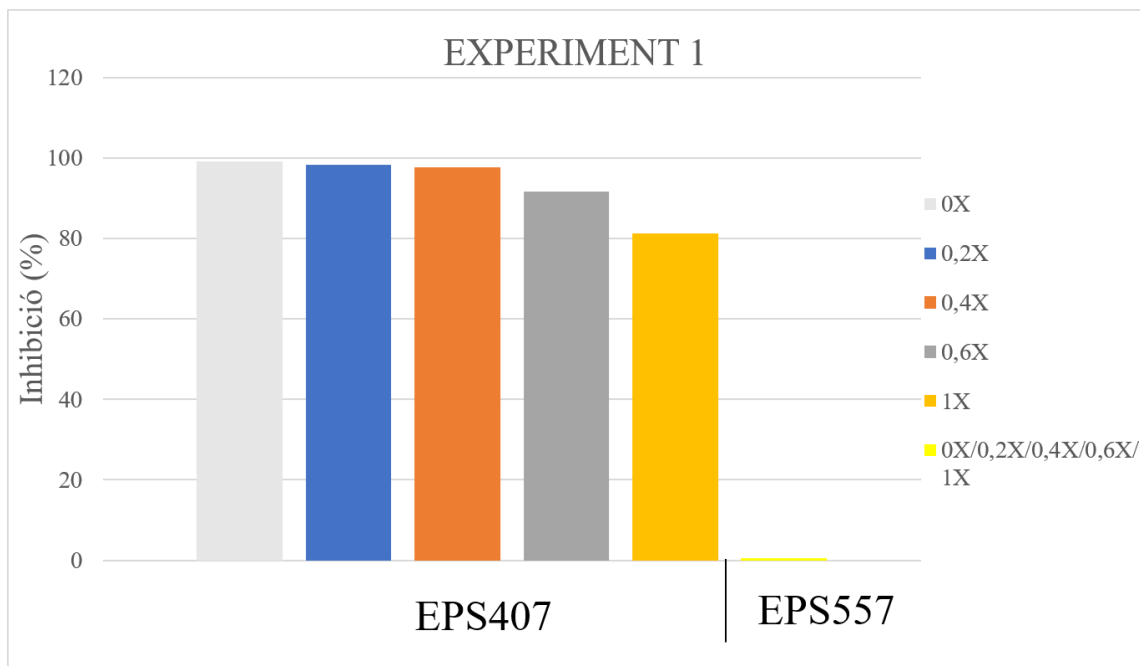


Figura 15. Efecte de la concentració de suplement de GA en la inhibició del creixement de Ea de SSC obtinguts de les soques EPS407 i EPS557.

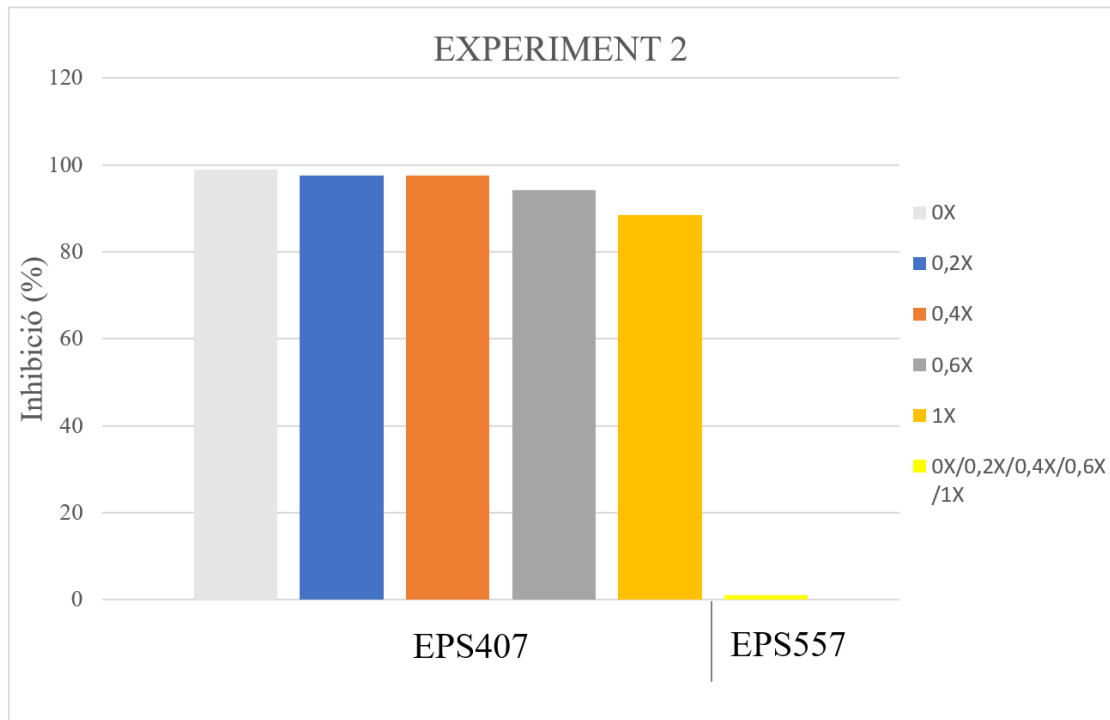


Figura 16. Efecte de la concentració de suplement de GA en la inhibició del creixement de Ea de SSC obtinguts de les soques EPS407 i EPS557

En els dos experiments realitzats es pot veure clarament com els SSC obtinguts de la soca EPS407 inhibeixen el creixement d'Ea, però a mesura que s'incrementa la concentració de suplement de medi GA, aquesta inhibició va disminuint progressivament. Aquests resultats indiquen que a mesura que s'incrementa la concentració del suplement es produeix una inactivació dels compostos presents en el SSC i per tant es redueix la seva activitat.

Per altra banda, en relació als SSC obtinguts de la soca EPS557 es pot veure que no es produeix cap inhibició i totes les concentracions de suplement del medi creixen igual que el control positiu.

5.3 ACTIVITAT ANTIBACTERIANA DEL SSC DE *Pantoea spp.*

En les Taules 3 i 4, es mostra el percentatge d'inhibició del creixement dels bacteris indicadors obtingut pels SSC dels cultius de les diferents soques de *Pantoea spp.* seleccionades en els dos experiments realitzats.

Taula 3: Activitat antibacteriana dels SSC de *Pantoea spp.* enfront 4 patògens indicadors.

EXPERIMENT 1																							
Soca			Ea			Soca			Psa			Soca			Pst			Soca			Xav		
C9-1	97,7	a	EPS399	100,0	a	EPS396	100,0	a	EM13cb	98,7	a												
EPS396	97,6	a	EPS396	99,0	a	Eh318	95,5	ab	Va2197	96,2	a												
Va2197	97,6	a	EPS397	98,1	a	Va2197	95,2	ab	Eh318	94,1	a												
EM13cb	97,3	a	Va2197	96,9	ab	EM13cb	91,8	ab	C9-1	93,5	a												
Eh318	94,6	ab	Eh318	92,3	abc	C9-1	82,3	ab	Eh-1087	81,9	ab												
EPS412	92,3	abc	EM13cb	90,5	abc	Eh-1087	77,2	b	EPS559	56,0	bc												
EPS21	88,5	abc	C9-1	80,7	abcd	EPS394	50,9	c	EPS400	43,8	cd												
EPS559	88,0	abc	EPS395	71,9	abcde	EPS400	50,9	c	EPS412	41,8	cde												
EPS551	87,1	abc	EPS553	64,7	bcdef	EPS393	49,1	cdd	EPS407	40,0	cdefg												
EPS553	87,1	abc	Eh-1087	62,4	cdef	EPS490	43,0	cde	EPS21	34,5	cdefg												
EPS481	86,0	abc	EPS559	61,6	cdef	EPS21	40,9	cdef	EPS554	31,5	cdefgh												
EPS552	79,3	abc	EPS401	54,1	defg	EPS407	40,5	cdef	EPS552	24,4	cdefgh												
Eh-1087	72,4	bc	EPS407	52,3	defgh	EPS391	39,2	ccdefg	EPS553	24,2	cdefgh												
EPS407	68,8	c	EPS481	48,1	efghi	EPS390	38,9	cdefg	EPS411	20,2	defgh												
EPS490	59,7	d	EPS552	45,8	efghi	EPS408	37,3	cdefgh	EPS551	19,6	defgh												
EPS125	38,0	de	EPS412	43,0	efghij	EPS399	37,1	cdefghi	EPS490	10,0	efgh												
EPS393	32,9	def	EPS554	41,0	efghijk	EPS559	36,7	cdefghi	EPS414	9,0	fgh												
EPS394	32,5	defg	EPS490	39,6	fghijk	EPS557	34,7	cdefghij	EPS396	8,9	fgh												
EPS391	32,1	defg	EPS394	38,3	fghijk	EPS395	34,0	cdefghij	EPS397	4,4	gh												
EPS388	32,0	defg	EPS551	35,7	fghijklm	EPS409	32,7	cdefghijk	EPS413	3,8	gh												
EPS399	31,3	defg	EPS21	28,9	ghijklm	EPS411	32,4	cdefghijk	EPS399	3,6	gh												
EPS390	29,1	defg	EPS400	27,4	ghijklmn	EPS392	31,7	defghijk	P10c	2,8	gh												
EPS397	28,1	defg	EPS411	22,2	hijklmn	EPS401	30,3	efghijk	EPS394	2,1	h												
EPS392	27,6	defg	EPS414	21,5	hijklm	EPS397	29,9	efghijkl	EPS406	0,4	h												
P10c	27,2	defg	EPS413	20,2	ijklmn	EPS388	29,1	efghijkl	EPS395	0,2	h												
EPS395	27,0	defg	EPS125	19,9	ijklmn	EPS553	28,6	efghijkl	EPS481	0,0	h												
EPS557	17,8	efgh	EPS557	19,4	ijklmn	EPS413	28,0	efghijkl	EPS403	0,0	h												
EPS554	12,1	fgh	EPS393	15,4	ijklmn	EPS403	27,2	efghijkl	EPS125	0,0	h												
EPS403	8,4	gh	EPS408	11,0	klmn	EPS554	22,8	fghijklm	EPS393	0,0	h												
EPS400	0,0	h	EPS392	10,4	klmn	EPS481	20,8	ghijklmn	EPS391	0,0	h												
EPS401	0,0	h	EPS388	6,9	lmn	EPS406	19,6	hijklmn	EPS388	0,0	h												
EPS406	0,0	h	EPS409	6,5	mn	EPS414	18,5	ijklmn	EPS390	0,0	h												
EPS408	0,0	h	EPS390	4,4	mn	EPS125	16,1	ijklmn	EPS392	0,0	h												
EPS409	0,0	h	EPS403	0,0	n	EPS552	15,0	klmn	EPS557	0,0	h												
EPS411	0,0	h	EPS391	0,0	n	EPS412	11,3	lmn	EPS401	0,0	h												
EPS413	0,0	h	P10c	0,0	n	EPS551	7,4	mn	EPS408	0,0	h												
EPS414	0,0	h	EPS406	0,0	n	P10c	2,2	n	EPS409	0,0	h												

Taula 4: Activitat antibacteriana del SSC de *Pantoea spp.*

EXPERIMENT 2											
Soca		Ea		Psa			Pst			Xav	
EPS396	97,5	a	EPS399	100,0	a	EPS396	100,0	a	Va2197	93,8	a
Va2197	97,4	a	EPS396	98,5	a	Va2197	96,2	a	Eh318	92,2	ab
Eh318	95,3	ab	Va2197	91,7	a	Eh318	95,7	a	C9-1	91,8	ab
EPS21	93,5	ab	Eh318	91,4	a	C9-1	92,8	a	EM13cb	89,9	ab
C9-1	93,1	ab	EM13cb	89,5	a	EM13cb	90,9	a	Eh-1087	81,9	abc
EPS553	90,1	ab	EPS397	87,9	a	Eh-1087	89,7	a	EPS559	59,7	bcd
EPS559	88,8	abc	Eh-1087	78,5	ab	EPS481	64,2	b	EPS407	55,1	cd
EM13cb	87,8	abc	EPS395	77,3	ab	EPS394	51,6	bc	EPS553	51,9	cd
EPS551	87,3	abc	C9-1	75,5	ab	EPS414	50,0	cbd	EPS21	36,1	def
EPS552	85,4	bc	EPS392	58,5	bc	EPS21	48,6	bcde	EPS412	34,1	defg
EPS412	85,1	bc	EPS553	57,9	bc	EPS408	45,5	bcdef	EPS400	29,2	defgh
EPS481	78,7	cd	EPS407	56,1	bc	EPS390	44,9	bcdef	EPS551	28,7	defgh
EPS490	75,5	de	EPS559	56,0	bc	EPS391	43,7	cdef	EPS552	15,4	efgh
P10c	72,1	de	EPS481	55,2	bc	EPS409	41,4	cdefg	EPS490	15,3	efgh
Eh-1087	70,0	de	P10c	54,6	bc	P10c	41,0	cdefg	EPS554	12,0	efgh
EPS407	65,5	e	EPS412	45,7	cd	EPS411	39,6	cdefg	EPS396	8,9	efgh
EPS394	45,1	f	EPS490	44,0	cd	EPS392	38,0	cdefgh	EPS406	4,0	fgh
EPS388	34,7	f	EPS552	38,6	cde	EPS397	37,3	cdefgh	P10c	3,1	gh
EPS391	33,7	g	EPS21	36,2	cde	EPS400	36,3	cdefgh	EPS399	1,1	h
EPS390	31,5	g	EPS551	35,8	cde	EPS557	35,3	cdefgh	EPS481	0,8	h
EPS392	31,1	g	EPS393	33,9	cdef	EPS490	35,0	cdefgh	EPS414	0,7	h
EPS125	29,8	g	EPS554	32,4	cdef	EPS388	34,9	cdefgh	EPS413	0,7	h
EPS399	27,6	g	EPS413	24,8	defg	EPS407	34,8	cdefgh	EPS409	0,4	h
EPS397	27,4	g	EPS414	22,4	defg	EPS413	33,9	cdefgh	EPS394	0,3	h
EPS393	26,5	g	EPS557	21,9	defg	EPS399	33,7	cdefghi	EPS403	0,0	h
EPS557	26,0	g	EPS394	18,9	defg	EPS401	32,5	cdefghi	EPS125	0,0	h
EPS395	25,6	g	EPS408	18,9	defg	EPS554	31,2	defghij	EPS393	0,0	h
EPS554	9,7	h	EPS125	17,3	defg	EPS393	29,9	efghijk	EPS391	0,0	h
EPS408	7,2	h	EPS400	15,3	efg	EPS406	29,8	efghijk	EPS388	0,0	h
EPS403	5,1	h	EPS401	11,7	efg	EPS553	27,6	fghijk	EPS390	0,0	h
EPS400	0,0	h	EPS409	10,5	efg	EPS559	26,6	fghijk	EPS397	0,0	h
EPS401	0,0	h	EPS390	10,4	efg	EPS403	23,3	ghijk	EPS392	0,0	h
EPS406	0,0	h	EPS411	7,3	fg	EPS125	19,8	hijk	EPS395	0,0	h
EPS409	0,0	h	EPS388	6,4	fg	EPS551	19,0	hijk	EPS557	0,0	h
EPS411	0,0	h	EPS406	1,5	g	EPS412	14,1	ijk	EPS401	0,0	h
EPS413	0,0	h	EPS391	0,5	g	EPS552	12,3	jk	EPS408	0,0	h
EPS414	0,0	h	EPS403	0,0	g	EPS395	11,2	k	EPS411	0,0	h

Com es pot apreciar en els dos experiments realitzats per determinar l'activitat antimicrobiana dels SSC de les diferents soques de *Pantoea* enfront els 4 bacteris indicadors en relació als dos experiments, s'ha obtingut uns resultats molt semblants.

Respecte a les soques amb més activitat enfront els diferents patògens destaquen els SSC obtinguts a partir de les soques de *Pantoea* de referència, essent els més actius els de les soques Va2197, Eh318, Eh1087 i C9-1. Per altra part, en relació a les soques EPS, tal com s'indica en la taula 5 i 6, alguns SSC presenten percentatges d'inhibició elevats, superiors al 65% (percentatge que ens indica que s'ha produït una inhibició considerable).

Destaca els SSC obtinguts a partir de la soca EM13cb que va mostrar activitat enfront els 4 patògens i de la soca EPS396 que va mostrar una elevada activitat enfront Ea, Psa i Pst en els dos experiments realitzats.

Taula 5: Activitat antibacteriana del SSC de *Pantoea spp.* de les soques EPS.

EXPERIMENT 1											
Soca	Ea		Soca	Psa		Soca	Pst		Soca	Xav	
EPS396	97,6	a	EPS399	100,7	a	EPS396	100,0	a	EM13cb	98,7	a
EM13cb	97,3	a	EPS396	99,0	a	EM13cb	91,8	ab			
EPS412	92,3	abc	EPS397	98,1	a						
EPS21	88,5	abc	EM13cb	90,5	abc						
EPS559	88,0	abc	EPS395	71,9	abcd						
EPS551	87,1	abc									
EPS553	87,1	abc									
EPS481	86,0	abc									
EPS552	79,3	abc									
EPS407	68,8	c									

Taula 6: Activitat antibacteriana del SSC de *Pantoea spp.* de les soques EPS.

EXPERIMENT 2													
Soca		Ea		Psa			Pst			Soca		Xav	
EPS396	97,5	a	EPS399	100,0	a	EPS396	100,0	a	EM13cb	89,9	ab		
EPS21	93,5	ab	EPS396	98,5	a	EM13cb	90,9	a					
EPS553	90,1	ab	EM13cb	89,5	a								
EPS559	88,8	abc	EPS397	87,9	a								
EM13cb	87,8	abc	EPS395	77,3	ab								
EPS551	87,3	abc											
EPS552	85,4	bc											
EPS412	85,1	bc											
EPS481	78,7	cd											
EPS490	75,5	de											
EPS407	65,5	e											

Els SSC obtinguts de les soques EPS van mostrar una activitat inhibidora més elevada enfront Ea.

Concretament, 10 soques (EPS396, EPS21, EPS553, EPS559, EPS551, EPS552, EPS412, EPS481, EPS407 i EM13cb) tenen un percentatge d'inhibició superior al 65%, i la soca EPS490 que va mostrar activitat elevada en el segon experiment. Pel que fa a l'activitat dels SSC enfront Psa i Pst, 5 soques van presentar activitat antibacteriana enfront Psa i 2 soques enfront Pst. Pel que fa a Xav només la soca EM13cb va mostrar activitat antibacteriana juntament amb algunes soques de referència.

5.4 INHIBICIÓ CÈL·LULA A CÈL·LULA ENFRONT FONGS FITOPATOGENS

Per avaluar la inhibició cèl·lula a cèl·lula enfront fongs fitopatògens primer es va determinar que el millor medi de cultiu per realitzar la sobrecapa dels fongs era el medi PDA amb una concentració de 10^4 conidis per mil·lilitre. El millor mètode dels 4 realitzats (descrits en l'apartat 4.6.2) per determinar l'activitat inhibidora enfront Fa, Fo i Pe era posant en contacte la sobrecapa del fong amb discos d'un cultiu homogeni en superfície de les soques de *Pantoea*. Per altra banda, en el cas de Bc es van realitzar cultius duals posant un disc d'un cultiu de Bc en medi PDA al centre i els discos procedents de cultius de les soques bacterianes. En la taula 7, es mostren les diferents activitats inhibidores de les soques de *Pantoea* utilitzades enfront els 4 fongs fitopatògens indicadors.

Taula 7: Inhibició cèl·lula a cèl·lula.

Soca	Pe	Fo	Fa	Bc
<i>Bacillus</i> EPS2017	+++	+++	+++	+++
EPS125	---	---	---	---
EPS388	---	---	---	---
EPS390	---	---	---	---
EPS391	---	---	---	---
EPS392	---	---	---	---
EPS393	---	---	---	---
EPS394	---	---	---	---
EPS395	---	---	---	---
EPS396	---	---	---	---
EPS397	---	---	---	---
EPS399	---	---	---	---
EPS400	---	---	---	---
EPS401	---	---	---	---
EPS403	---	---	---	---
EPS406	---	---	---	---
EPS407	---	+++*	---	+++*
EPS408	---	---	---	---
EPS409	---	---	---	---
EPS411	---	---	---	---
EPS412	---	---	---	---
EPS413	---	---	---	---
EPS414	---	---	---	---
EPS481	---	---	---	---
EPS490	---	---	---	---
EPS551	---	---	---	---
EPS552	---	---	---	---
EPS553	---	---	---	---
EPS554	---	---	---	---
EPS557	---	---	---	---
EPS559	---	---	---	---
EPS21	---	---	---	---
Va2197	---	---	---	---
P10c	---	---	+++*	---
Eh319	---	---	---	---
EM13cb	+++*	---	---	---
Eh1087	---	---	---	---
C9-1	+++*	---	+++*	+++*

*Hi ha creixement bacterià i el fong no avança

+++ : Diàmetre halo d'inhibició superior a 25 mm; ++ : entre 25 i 15 mm; + : inferior a 15mm

La soca de referència del gènere *Bacillus spp* és l'única que va presentar activitat antagonista enfront els 4 fongs indicadors produint halos d'inhibició de més de 25 mm. La soca EPS407 va mostrar activitat inhibidòria enfront Fo i Bc, P10c va mostrar activitat enfront Fa, EM13cb enfront Pe i C9-1 que va mostrar l'activitat de major espectre, ja que provocava la inhibició de Pe, Fa i Bc. La resta de soques no presenten cap inhibició enfront els fongs patògens i tampoc creixen enfront els diferents patògens.

6 DISCUSSIÓ

Les malalties d'origen bacterià i fúngic provoquen grans pèrdues econòmiques al llarg de l'any en el sector agrícola. Actualment, hi ha un gran interès en desenvolupar productes innovadors capaços de fer front a les malalties d'una manera menys tòxica i natural, obrint els mercats a nous productes pel maneig de les diferents malalties que es troben als conreus. Entre els nous productes hi ha els bioplaguicides, plaguicides d'origen natural que inclouen microorganismes beneficiosos (agents de biocontrol) o consistents en compostos actius obtinguts a partir de microorganismes.

El present estudi té com a objectiu determinar l'activitat inhibidòria de diferents soques de *Pantoea spp.* enfront bacteris i fongs fitopatògens per la seva posterior aplicació en cultius com a bioplaguicides. Es va partir d'un estudi anterior on s'utilitzava la col·lecció de soques de *Pantoea*, en el que s'havia determinat mitjançant PCR la presència dels gens involucrats en la síntesi de les bacteriocines pantocina A, pantocina B i dapdiamides (Puchades, 2017) en les soques de la col·lecció. Els resultats d'aquest estudi van determinar que 11 soques (EPS21, EPS407, EPS412, EPS481, EPS490, EPS551, EPS552, EPS553, EPS556, EPS557 i EPS559) de les 194 soques estudiades presentaven el gen de síntesi de pantocina A, únicament el 5,7% de tota col·lecció, mentre que els gens de síntesi de la pantocina B només eren presents en les soques Eh1087, EM13cb i Va2197 i les dapdiamides només en la soca C9-1.

En el present estudi es va determinar quin medi era el més adient per l'obtenció de SSC per tal de determinar la seva activitat antimicrobiana enfront bacteris i fongs indicadors. Es van utilitzar 3 soques (EPS407, EPS557 i EPS559) que presentaven el gen de síntesi de pantocina A. Les soques EPS407 i EPS559 presentaven activitat antimicrobiana enfront Ea mentre que la soca EPS557 era inactiva. En l'estudi de comparació entre medis




es van utilitzar dos medis que afavorien la producció de metabòlits secundaris en *Pantoea*, com les pantocines. La composició baixa en nutrients sotmet a les cèl·lules a condicions límits de cultiu i indueix a la cèl·lula a metabolitzar metabòlits secundaris (Pusey et al., 2011). Els SSC obtinguts a partir del cultiu de les soques EPS407 i EPS559 en els diferents medis (GA i MM) presentaven elevada activitat antimicrobiana enfront del bacteri fitopatogen. Es va concloure que la millor opció era utilitzar el medi GA en l'obtenció del SSC perquè permetia el creixement òptim d'*E. amylovora*.

Un cop seleccionat el medi òptim, es van realitzar dos assajos amb l'objectiu de posar de manifest que l'esgotament de nutrients en els SSC no era el motiu per impedir el creixement dels patògens indicadors. En el primer assaig es volia determinar la concentració òptima de suplement de GA per permetre un creixement adequat dels diferents patògens indicadors. En el segon assaig, es pretenia determinar la concentració òptima de suplement que permetés el creixement del patogen indicador sense inactivar els compostos amb activitat antimicrobiana presents en els SSC. Les conclusions que es van poder extreure en els assajos van ser que les concentracions de suplement de medi 4X i 6X permetien un correcte creixement dels diferents patògens indicadors i no inactivaven el SSC. En canvi, el suplement 10X produïa un creixement molt alt de tots els patògens, però provocava una reducció de l'activitat. Per tant es pot determinar que l'augment de la concentració de suplement de medi GA provoca la disminució de la capacitat inhibidora del SSC. Per aquest motiu es va optar pel suplement 6X per realitzar els assajos d'activitat antibacteriana dels SSC de *Pantoea spp* perquè permetia un bon creixement dels patògens i no produïa una inactivació tan severa com en el suplement 10X. En base a resultats d'estudis anteriors es van seleccionar 31 soques que havien mostrat capacitat de síntesi de bacteriocines (Puchades, 2017) i/o tenien activitat antimicrobiana, a més es van escollir 5 soques de referència utilitzades com agents de biocontrol. Aquestes soques es van utilitzar per avaluar si els SSC tenien activitat antibacteriana enfront 4 bacteris fitopatògens, emprant el medi GA per cultivar les soques. Es va confirmar que el SSC de 14 soques tenien més d'un 65% d'activitat inhibidora enfront *E. amylovora* (5 soques són de referència), 8 en *Pseudomonas syringae pv actinidiae* (3 soques són de referència), 6 amb *Pseudomonas syringae pv. tomato* (4 soques són de referència) i 5 amb *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria* (4 soques són de referència). En la taula 8 s'indica amb el codi de colors el percentatge d'inhibició de cada soca i experiment enfront els bacteris patògens estudiats.

Taula 8: Resum dels percentatges d'inhibició dels SSC de *Pantoea spp.* enfront els bacteris fitopatògens.

Soca	Ea		Psa		Pst		Xav	
	EXP 1	EXP 2	EXP 1	EXP 2	EXP 1	EXP 2	EXP 1	EXP 2
C9-1*	Alta	Alta	Mitjana	Mitjana	Mitjana	Alta	Alta	Alta
Eh1087*	Mitjana	Mitjana	Baixa	Mitjana	Mitjana	Mitjana	Mitjana	Mitjana
Va2197*	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
P10c*	Baixa	Mitjana	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
Eh318*	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
EPS21	Mitjana	Alta	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS125	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS388	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS390	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS391	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS392	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS393	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS394	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS395	Baixa	Baixa	Mitjana	Mitjana	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS396	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Baixa	Baixa
EPS397	Baixa	Baixa	Alta	Mitjana	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS399	Baixa	Baixa	Alta	Alta	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS400	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS401	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS403	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS406	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS407	Mitjana	Mitjana	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS408	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS409	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS411	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS412	Mitjana	Mitjana	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS413	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS414	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS481	Mitjana	Mitjana	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS490	Baixa	Mitjana	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS551	Mitjana	Mitjana	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS552	Mitjana	Mitjana	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS553	Mitjana	Alta	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS554	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS557	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EPS559	Mitjana	Mitjana	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
EM13cb	Alta	Mitjana	Alta	Mitjana	Alta	Alta	Alta	Mitjana

* soques de referència que constitueixen ingredients actius de bioplaguicides comercials i/o que presenten gens relacionats amb la síntesi de bacteriocines.

% Inhibició dels patògens indicadors	Baixa		Mitjana		Alta	
	<65%		65-90%		>90%	

Les soques de referència Eh1087, Va2197, C9-1, Eh318 presentaven activitat inhibidòria enfront els 4 bacteris fitopatògens. Pel que fa a les soques de la col·lecció PV-CIDSAV, les més actives enfront els bacteris estudiats van ser les soques EPS396 i EM13cb. Es pot destacar que les soques Eh1087, Va2197 i EM13cb produeixen pantocina B, la soca Eh318 pantocina A, la soca C9-1 pantocina tipus A i també dapdiamides (Kamber *et al.* 2012). Aquests resultats podrien indicar que aquests pèptids són els causants de la inactivació del patogen. De tota manera hi ha soques com EPS557 que no presenta activitat antimicrobiana enfront cap patogen i també presenta el gen relacionat amb la síntesi de la pantocina A. En canvi, la soca EPS396 presenta activitat d'ampli espectre però no produeix cap dels compostos antimicrobians estudiats.

Per altra banda, el fet que hi hagi una major activitat inhibidòria de les soques de *Pantoea* enfront Ea podria estar relacionada amb la proximitat filogenètica entre les soques del gènere *Pantoea* i el patogen *E. amylovora* (Rezzonico *et al.* 2009). Es produeix una inhibició molt més elevada de *E. amylovora* utilitzant SSC procedents de soques del gènere *Pantoea*. Per altra banda, l'activitat antagonista de soca Eh318 ja estava descrita (Wright *et al.*, 2001) corroborant els resultats obtinguts en l'assaig d'activitat antibacteriana.

Un altre objectiu que es va abordar en el present treball va ser seleccionar les soques que mostraven activitat antimicrobiana enfront a 4 fongs fitopatògens, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum*, *Penicillium expansum* i *Botrytis cinerea*. Per aquest motiu es van realitzar diferents estudis preliminars per determinar el mètode més adient.

Es va determinar el medi de cultiu i el millor mètode per determinar l'activitat inhibidòria dels fongs. Les condicions òptimes per realitzar la sobrecreixença en placa amb els diferents fongs fitopatògens va ser utilitzant una concentració de 10^4 conidis/ml i el medi PDA per realitzar la sobrecreixença, ja que amb medi GA no es produïa un creixement homogeni del fong. En canvi, en el cas de *Botrytis cinerea* el millor mètode va ser posar un disc de medi de cultiu amb el fong al mig de la placa i no realitzar una sobrecreixença del fong, ja que no creixia de forma homogènia. Finalment, les diferents soques de *Pantoea* es dipositaven en contacte amb el fong mitjançant un disc de medi GA amb les cèl·lules de les diferents soques.

En relació a l'activitat inhibidòria de les soques de *Pantoea* es va determinar que cap tenia la suficient activitat per inhibir els 4 fongs fitopatògens emprats. La soca de referència

del gènere *Bacillus* va mostrar activitat antimicrobiana enfront els 4 fongs, i les soques EPS407, P10c, EM13cb i C9-1 frenaven el creixement dels fongs i tenien capacitat per créixer, però no produïen halos d'inhibició clars.

En relació a tot l'exposat en aquest treball, les soques EPS21, EPS396, EPS397, EPS399, EPS412, EPS481, EPS551, EPS553, EPS559 i EM13cb, tenen característiques positives i poden ser candidats per la producció de bioplaguicides o formar compostos actius enfront bacteris fitopatògens.

7 APLICABILITAT

En el present estudi s'han obtingut resultats prometedors orientats al desenvolupament de futurs bioplaguicides per a la seva aplicació en l'àmbit de la patologia vegetal. Aquests, podrien constituir una nova estratègia de maneig de malalties en conreus d'alt valor econòmic. Concretament, en aquest treball s'han seleccionat les soques de *Pantoea spp.* que produeixen SSC amb més activitat enfront els bacteris fitopatògens estudiats. En futurs estudis, caldrà realitzar l'extracció, purificació i concentració dels compostos de més activitat antimicrobiana presents en els SSC.

A continuació s'haurien de realitzar assajos d'eficàcia en plantes per confirmar si l'activitat antimicrobiana enfront els bacteris patògens observada *in vitro* es manté. Un cop comprovat i depenen dels resultats obtinguts en plantes, es podria realitzar un escalat en la metodologia per obtenir els SSC utilitzant volums més grans, mitjançant diferents aparells biotecnològics per obtenir SSC amb activitat antimicrobiana d'una manera eficient i econòmicament més rentable.

Amb l'objectiu final de l'aplicació del SSC purificat i concentrat en conreus i cultius com a ingredient actiu d'un producte fitosanitari o com a bioplaguicida.

8 CONCLUSIONS

- El medi de cultiu GA permet un millor creixement d'*E. amylovora* que el medi MM.
- L'addició d'un suplement de medi GA 6X als SSC permet un correcte creixement dels diferents bacteris patògens sense inactivar els SSC.
- Els SSC obtinguts de cultius de les soques EPS396, Va2197, Eh318, EPS21, C9-1, EPS553, EPS559, EM13cb, EPS551, EPS552, EPS412, EPS481, P10c, Eh-1087 i EPS407 de la col·lecció de *Pantoea spp.* presenten activitat antibacteriana enfront *E. amylovora*.
- Els SSC obtinguts de cultius de les soques EPS399, EPS396, Va2197, Eh318, EM13cb, EPS397, Eh-1087, EPS395 i C9-1 presenten activitat antibacteriana enfront *P. syringae pv actinidiae*.
- Els SSC obtinguts de cultius de les soques EPS396, Va2197, Eh318, C9-1, EM13cb i Eh-1087 presenten activitat antibacteriana enfront *P. syringae pv. tomato*.
- Els SSC obtinguts de cultius de les soques Va2197, Eh318, C9-1, EM13cb i Eh-1087 presenten activitat antibacteriana enfront *X. axonopodis pv. vesicatoria*.
- La soca EPS407 creix en presència de *F. oxysporum* i *B. cinerea*, la soca P10c creix en *F. avenaceum*, la soca EM13cb pot créixer en presència de *P. expansum* i finalment la soca C9-1 creix en presència de *P. expansum*, *F. avenaceum* i *B. cinerea*, però cap d'aquestes soques formen halos d'inhibició. La soca de referència del gènere *Bacillus* sí que produeix halo d'inhibició amb diàmetres superiors a 25 mm enfront tots 4 fongs patògens.

9 BIBLIOGRAFIA

Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M. M., Rajković, A., ... & De Meulenaer, B. (2007). Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3), 170-181.

Basim, H., Basim, E., Jones, J. B., Minsavage, G. V., & Dickstein, E. R. (2004). Bacterial spot of tomato and pepper caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in the western Mediterranean region of Turkey. *Plant disease*, 88(1), 85-85.

Brady, S. F., Wright, S. A., Lee, J. C., Sutton, A. E., Zumoff, C. H., Wodzinski, R. S., ... & Clardy, J. (1999). Pantocin B, an antibiotic from *Erwinia herbicola* discovered by heterologous expression of cloned genes. *Journal of the American Chemical Society*, 121(50), 11912-11913.

Cambra Alvarez, M. A., Palacio Bielsa, A., Lozano Tomás, C. M., & Crespo Alarcón, J. (2012). El fuego bacteriano 'Erwinia amylovora'.

Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas.

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N. (Eds.). (2004). *Botrytis: biology, pathology and control*. Springer Science & Business Media.

Froud K.J., Everett K.R., Tyson J.L., Beresford R.M., Cogger N. (2015) Review of the risk factors associated with kiwifruit bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *New Zealand Plant Protection*, 68, 313–327.

Gupta, S., & Dikshit, A. K. (2010). Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. *Journal of Biopesticides*, 3(Special Issue), 186.

Johnson, K. B., Stockwell, V. O., Sawyer, T. L., & Sugar, D. (2000). Assessment of environmental factors influencing growth and spread of *Pantoea agglomerans* on and among blossoms of pear and apple. *Phytopathology*, 90(11), 1285-1294.

- Kamber, T., Lansdell, T. A., Stockwell, V. O., Ishimaru, C. A., Smits, T. H., & Duffy, B. (2012). Characterization of the biosynthetic operon for the antibacterial peptide herbicolin in *Pantoea vagans* biocontrol strain C9-1 and incidence in *Pantoea* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4412-4419.
- Ministerio de Agricultura (2021). *Resitro de Productis Fitosanitarios* [En línia] Accessible a: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp> (productes fitosanitaris en espanya).
- Mol-Instincts. (2018). *Molecular Weight of Pantocin A and B* [En línia] Accessible a: <https://www.molinstincts.com/molecular-weight/Pantocin-A-mowt-CT1106636784.html>
- Montesinos Seguí, E. (2006). Pesticides using microorganisms. *Phytoma España (España)*.
- Murray, R. E., Candan, A. P., & Vazquez, D. E. (2019). *Manual de poscosecha de frutas: manejo integrado de patógenos*. Ediciones INTA.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
- Omarini, A. B., Achimón, F., Brito, V. D., & Zygadlo, J. A. (2020). Fermentation as an Alternative Process for the Development of Bioinsecticides. *Fermentation*, 6(4), 120.
- Palacio Bielsa, A., Fortanete Navarro, J., & González Alcubilla, M. L. (2005). El fuego bacteriano de las *rosáceas* en Aragón: medidas de control.
- Palacio-Bielsa, A., Lopez-Quilez, A., Llorente, I., Ruz, L., López, M. M., & Cambra, M. A. (2012). Criteria for efficient prevention of dissemination and successful eradication of *Erwinia amylovora* (the cause of fire blight) in Aragón, Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 505-518.
- Puchades, M. (2017). *Obtención de péptidos antimicrobianos producidos por Pantoea spp.* Departament Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària. Universitat de Girona.
- Pusey, P. L., Stockwell, V. O., Reardon, C. L., Smits, T. H. M., & Duffy, B. (2011). Antibiosis activity of *Pantoea agglomerans* biocontrol strain E325 against *Erwinia amylovora* on apple flower stigmas. *Phytopathology*, 101(10), 1234-1241.

Rampersad, S. N. (2020). Pathogenomics and management of Fusarium diseases in plants. *Pathogens*, 9(5), 340.

Reglament (UE) 2020/885 relatiu a les mesures per impedir la introducció i la propagació a la Unió de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Takikawa, Serizawa, Ichikawa, Tsuyumu & Goto.

Reglamento (CE) 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios.

Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.

Rezzonico, F., Smits, T. H., Montesinos, E., Frey, J. E., & Duffy, B. (2009). Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC microbiology*, 9(1), 1-18.

Sundin, G. W., Werner, N. A., Yoder, K. S., & Aldwinckle, H. S. (2009). Field evaluation of biological control of fire blight in the eastern United States. *Plant Disease*, 93(4), 386-394.

Tilman, D. (1999). Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 5995-6000.

Uppalapati, S. R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Urbanczyk-Wochniak, E., Ishiga, T., Mysore, K. S., & Bender, C. L. (2008). Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato seedlings: phenotypic and gene expression analyses of the virulence function of coronatine. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(4), 383-395.

Walterson, A. M., & Stavrínides, J. (2015). *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae*. *FEMS microbiology reviews*, 39(6), 968-984.

Wright, S. A., Jin, M., Clardy, J., & Beer, S. V. (2004, July). The biosynthetic genes of pantocin A and pantocin B of *Pantoea agglomerans* Eh318. In *X International Workshop on Fire Blight 704* (pp. 313-320).

Wright, S. A., Zumoff, C. H., Schneider, L., & Beer, S. V. (2001). *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* *in vitro*. *Applied and environmental microbiology*, 67(1), 284.

ANNEX I: PROCEDÈNCIA DE LES SOQUES EPS

Soques del gènere *Pantoea spp.* en la col·lecció del grup CIDSAV.

Codi	Procedència	Òrgan	Espècie hoste
EPS226	Girona	Arrel	<i>Pyrus communis</i>
EPS307	Setcases	Arrel	<i>Sarotamnus</i>
EPS311	Coll de Merolla	Arrel	<i>Trigonella</i>
EPS325	Fornells	arrel	<i>Helianthus annuus</i>
EPS342	Lleida	gemma	<i>Prunus domestica</i>
EPS388	Viader	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Doyenne du Comice</i>)
EPS390	Banyoles	fulla	<i>Graminia</i>
EPS391	Palamós	flor	<i>Prunus amygdalus</i>
EPS392	Vidal	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Passe Crassane</i>)
EPS393	Sibina	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Passe Crassane</i>)
EPS394	Pont de molins	flor	<i>Prunus avium</i>
EPS395	Banyoles	fulla	<i>Graminia</i>
EPS396	Cadena	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Passe Crassane</i>)
EPS397	Mas Badia	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Passe Crassane</i>)
EPS399	Sibina	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>P Crassane</i>)
EPS400	F. Bosch	gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS401	Ventall	flor	<i>Prunus amygdalus</i>
EPS403	F. Bosch	gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS405	Gispert	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS406	Gispert	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS407	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS408	Gispert	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS409	Gispert	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>Conference</i>)
EPS411	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus malus</i> (<i>Golden</i>)
EPS412	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus malus</i> (<i>Royal gala</i>)
EPS413	Can Calonge	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>G.Leclerc</i>)
EPS414	Can Calonge	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>G.Leclerc</i>)
EPS415	Can Calonge	gemma	<i>Pyrus communis</i> (<i>G.Leclerc</i>)

EPS416	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS417	Can Calonge	gemma	<i>Pyrus communis (G. Leclerc)</i>
EPS418	Gispert	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS425	Gualta	gemma	<i>Pyrus malus (starking)</i>
EPS426	S. Iscle	gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS427	Vilabertran	flor	<i>Prunus armeniaca</i>
EPS428	S Iscle	gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS429	Casadell	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS430	Casadell	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS431	Vilabertran	flor	<i>Prunus armeniaca</i>
EPS432	Cabanes	flor	<i>Prunus spinosa</i>
EPS433	S Iscle	gemma	<i>Pyrus communis (bord)</i>
EPS434	Casadell	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS435	S Iscle	gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS436	Torroella de Fluvià	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS437	S Iscle	gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS439	Cassà de la Selva	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS440	Gualta	gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS441	L'armentera	flor	<i>Prunus avium</i>
EPS442	S. Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus malus (top red)</i>
EPS443	L'armentera	gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS444	S. Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus malus (Golden)</i>
EPS445	S. Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus malus (Golden)</i>
EPS446	Tarragona	fulla	<i>Corylus avellana</i>
EPS447	L'armentera	flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS448	Viladomat	gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS449	S. Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS450	L'armentera	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS451	Vilamacolum	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS452	Viladomat	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS453	Viladomat	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS454	Vilamacolum	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS455	L'armentera	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS456	S. Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus malus (Starking)</i>
EPS457	S. Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus malus (Starking)</i>
EPS458	S. Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus malus (Starking)</i>
EPS459	S. Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS460	Viladomat	gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS461	L'armentera	flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS466	Santa Coloma de Farnes	gemma	<i>Pyrus communis (Grand Champion)</i>
EPS467	Gispert	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS468	St Iscle	gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS469	St Iscle	gemma	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS470	Casadell	flor	<i>Pyrus communis</i>
EPS471	Casadell	flor	<i>Pyrus communis</i>
EPS472	Tarragona	gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS473	Tarragona	gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS474	Casademont	gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS475	Sibina	gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS476	Sibina	gemma	<i>Prunus persica</i>

EPS477	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus malus (Royal gala)</i>
EPS478	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus malus (Royal gala)</i>
EPS479	Gualta	gemma	<i>Pyrus malus (Starking)</i>
EPS480	Vilamacolum	flor	<i>Prunus persica (Baby Gold)</i>
EPS481	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus malus (Royal gala)</i>
EPS482	Roman	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS483	Gispert	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS484	Gualta	gemma	<i>Pyrus malus (Strarking)</i>
EPS485	Gualta	gemma	<i>Pyrus malus (Strarking)</i>
EPS486	S Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus malus (Top red)</i>
EPS487	Vilamacolum	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS488	S Pere Pescador	gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS489	S Iscle	gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS490	L'armentera	gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS491	Vilamacolum	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS492	S Coloma de Farnés	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS493	S Coloma de Farnés	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS494	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus malus (Golden)</i>
EPS495	Viladomat	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS496	Viladomat	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS497	Tarragona	gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS498	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS499	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus malus (Golden)</i>
EPS500	Tarragona	gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS501	Gualta	gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS502	Casadell	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS503	Gualta	gemma	<i>Prunus persica</i>
EPS504	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS505	Cadena	gemma	<i>Pyrus communis (Passe Crassane)</i>
EPS506	Cadena	gemma	<i>Pyrus communis (Passe Crassane)</i>
EPS507	Viladomat	flor	<i>Prunus avium</i>
EPS508	Viladomat	flor	<i>Prunus avium</i>
EPS509	Can Calonge	gemma	<i>Pyrus communis (General Leclerc)</i>
EPS510	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus communis (Comice)</i>
EPS511	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus communis (Comice)</i>
EPS512	Mas Badia	gemma	<i>Pyrus malus (G. Wellspur)</i>
EPS513	Mas Badia	gemma	<i>Pyrus malus (G. Wellspur)</i>
EPS514	Sibina	gemma	<i>Pyrus communis (Passe Crassane/Alexandrine)</i>
EPS515	Sibina	gemma	<i>Pyrus communis (Passe Crassane/Alexandrine)</i>
EPS516	Sibina	gemma	<i>Pyrus communis (Passe Crassane/Alexandrine)</i>

EPS517	Vidal	gemma	<i>Pyrus communis (Passe Crassane)</i>
EPS518	Vidal	gemma	<i>Pyrus communis (Passe Crassane)</i>
EPS519	Vidal	gemma	<i>Pyrus communis (Passe Crassane)</i>
EPS520	Cassà de la Selva	gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS521	S. Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS522	S. Pere Pescador	gemma	<i>Pyrus communis</i>
EPS523	Gispert	gemma	<i>Pyrus malus (Golden)</i>
EPS524	Tarragona (El Catllar)	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS525	Tarragona (El Catllar)	flor	<i>Prunus persica</i>
EPS526	S. Pere Pescador	geema	<i>Pyrus malus (Starking)</i>
EPS527	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus communis (Passe Crassane)</i>
EPS528	Mas Oller	gemma	<i>Pyrus communis (Passe Crassane)</i>
EPS540	Calonge	gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS541	Calonge	gemma	<i>Prunus avium</i>
EPS542	Calonge	flor	<i>Pyrus communis</i>
EPS543	Calonge	flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS544	Calonge	flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS545	Calonge	flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS546	Sant. Antoni de Calonge	fulla	<i>Pyrus communis</i>
EPS547	Sant. Antoni de Calonge	flor	<i>Prunus domestica</i>
EPS548	Can Calonge	fulla	<i>Cotoneaster</i>
EPS549	Sant Antoni de Calonge	fulla	<i>Prunus persica</i>
EPS551	Sant Juan de Palamós	fulla	<i>Prunus amygdalus</i>
EPS552	Sant Juan de Palamós	fulla	<i>Prunus amygdalus</i>
EPS553	Calonge	fulla	<i>Prunus persica</i>
EPS554	Calonge	fulla	<i>Prunus persica</i>
EPS556	Calonge	fulla	<i>Pyrus communis</i>
EPS557	Calonge	fulla	<i>Pyrus communis</i>
EPS559	Calonge	fulla	<i>Prunus persica</i>
EPS560	Mas Oller	fulla	<i>Crataegus</i>
EPS562	Mas Oller	fulla	<i>Pyrus communisPasse Crassane</i>
EPS563	Mas Oller	fulla	<i>Crataegus</i>
EPS564	Mas Oller	flor	<i>Pyrus communis Conference</i>
EPS566	Mas Oller	fulla	<i>Crataegus</i>
EPS567	Can Calonge	fulla	<i>Pyrus communis General Leclerc</i>
EPS568	Mas Oller	flor	<i>Pyrus communis Passe Crassane</i>
EPS569	Mas Oller	flor	<i>Pyrus communis Conference</i>
EPS570	Can Calonge	flor	<i>Pyrus communis General Leclerc</i>
EPS572	Mas Oller	flor	<i>Crataegus</i>
EPS573	Mas Oller	flor	<i>Pyrus malus (Golden)</i>
EPS574	Mas Oller	flor	<i>Crataegus</i>
EPS575	Can Calonge	flor	<i>Pyrus communis General Leclerc</i>
EPS576	Mas Oller	fulla	<i>Pyrus communis General Leclerc</i>

EPS577	Can Calonge	flor	<i>Pyrus communis General Leclerc</i>
EPS592	Mas Badia	fulla	<i>Winter Nellis</i>
EPS593	Mas Badia	fulla	<i>Pyrus communis General Leclerc</i>
EPS594	Mas Badia	flor	<i>Pyrus malus</i>
EPS595	Mas Badia	fulla	<i>Pyrus communis (Winter Nellis)</i>
EPS596	Mas Badia	fulla	<i>Pyrus malus</i>
EPS603	Mas Badia	fulla	<i>Pyrus communis (General Leclerc)</i>
EPS604	Mas Badia	flor	<i>Pyrus malus</i>
EPS605	Santa Cristina	fulla	<i>Pyrus malus (Golden estandar)</i>
EPS606	Llagostera	fulla	<i>Crataegus</i>
EPS607	Mas Badia	fulla	<i>Pyrus communis (Roge Red)</i>
EPS608	Llagostera	fulla	<i>Crataegus</i>
EPS609	Mas Badia	fulla	<i>Pyrus malus</i>
EPS610	Santa Cristina	flor	<i>Pyrus malus (Golden estandar)</i>
EPS611	Llagostera	flor	<i>Crataegus</i>
EPS612	Llagostera	flor	<i>Crataegus</i>
EPS613	Mas Badia	fulla	<i>Prunus persica</i>
EPS614	Llagostera	flor	<i>Crataegus</i>
EPS615	Llagostera	flor	<i>Crataegus</i>
EPS616	Mas Badia	fulla	<i>Pyrus communis (Roge Red)</i>
EPS617	Mas Badia	fulla	<i>Pyrus communis (Roge Red)</i>
EPS618	Llagostera	fulla	<i>Crataegus</i>
EPS619	Santa Cristina	fulla	<i>Pyrus malus (Golden estandar)</i>
EPS620	Llagostera	fulla	<i>Crataegus</i>
EPS621	Mas Badia	fulla	<i>Pyrus communis (Roge red)</i>
EPS622	Santa Cristina	fulla	<i>Pyrus malus (Golden estandar)</i>
EPS10	Mas Oller (Cassà de la Selva)	fulla	<i>Pyrus communis (Passe Crassane)</i>
EPS13	Mas Oller (Cassà de la Selva)	fulla	<i>Pyrus communis (Passe Crassane)</i>
EPS21	Mas Oller (Cassà de la Selva)	fruit	<i>Pyrus communis (General Leclerc)</i>
EPS125	Mas Oller (Cassà de la Selva)	fruit	<i>Pyrus communis (Comice)</i>
EPS130	Mas Oller (Cassà de la Selva)	fruit	<i>Pyrus communis (Comice)</i>
EPS131	Mas Oller (Cassà de la Selva)	fruit	<i>Pyrus communis (Comice)</i>
EPS132	Mas Oller (Cassà de la Selva)	fruit	<i>Pyrus communis (Comice)</i>
EPS156	Mas Oller (Cassà de la Selva)	fulla	<i>Cydonia oblonga</i>
EPS202	Mas Oller (Cassà de la Selva)	fruit	<i>Pyrus communis (Conference)</i>
EPS210	Mas Oller (Cassà de la Selva)	fruit	<i>Pyrus communis (Conference)</i>

EPS230	Girona Fruits	fruit	<i>Pyrus malus</i> (Golden Smothee)
EPS237	Girona Fruits	fruit	<i>Pyrus communis</i> (Ercolini)
EPS273	El Redós (Pals)	fulla	<i>Vitis vinifera</i>
EPS283	El Redós (Pals)	fulla	<i>Prunus avium</i>

Les dades d'aquesta taula s'han obtingut de Kamber *et al.*, 2012

ANNEX II: COMPOSICIÓ MEDIS DE CULTIU

MEDI GA	
K₂HPO₄	11.5 g
KH₂PO₄	4.5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.12 g
Agar purificat	20 g
Aigua destil·lada	1000 ml
PART NO AUTOCLAVABLE (per filtració)	
Glucosa	20 g
L-Asparagina	0.3 g
Àcid nicotínic	0.05 g

TAMPÓ FOSFAT	
Na₂HPO₄	7.10 g
KH₂PO₄	2.72 g
Aigua destil·lada	1000 ml

MEDI PDB	
Midó de patata	20 g
Dextrosa	20 g
Aigua destil·lada	1000 ml

MEDI MM	
Na₂HPO₄	2,4 g
K₂HPO₄	3 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2 g
Glucosa	5 g
NH₄Cl	1 g
NaCl	0,5 g
Aigua destil·lada	1000 ml

MEDI LB	
Triptona	10 g
Extracte de llevat	5 g
NaCl	10 g
Agar purificat	15 g
Aigua destil·lada	1000 ml

MEDI PDA	
Midó de patata	20 g
Dextrosa	20 g
Agar purificat	20 g
Aigua destil·lada	1000 ml