



EPS

Escola Politècnica

UdG

Superior

Projecte/Treball Fi de Carrera

Estudi: Eng. Tècn. Agrícola Ind.Agràries i Aliment. Pla 99

Títol: Eficàcia de bacteris de l'àcid làctic en el control biològic del foc bacterià

Document: Memòria

Alumne: Núria Estañol Torres

Director/Tutor: Anna Bonaterra i Jesús Francés

Departament: Eng. Química, Agrària i Tecn. Agroalimentària

Àrea: Producció vegetal

Convocatòria (mes/any): 02/2014

AGRAÏMENTS

M'agradaria expressar el meu agraïment al Dr. Jesús Francés i a la Dra. Anna Bonaterra per tota l'ajuda proporcionada i per guiar-me durant la realització d'aquest treball de fi de carrera, també per la correcció de la memòria; juntament amb el Dr. Emili Montesinos, donar-los les gràcies per oferir-me l'oportunitat de realitzar el projecte de fi de carrera dins el grup de patologia vegetal de l'INTEA de l'UdG: poder participar en un grup de recerca m'ha estat molt profitós i didàctic.

A la Gemma Rosselló, vull agrair-li la paciència i dedicació durant tota la durada del procés experimental, tots els coneixements adquirits i la bona companyia.

Per últim, m'agradaria donar les gràcies als meus pares pel seu suport i a en Jordi pels ànims.

ÍNDIX DE MATÈRIES

ÍNDIX DE MATÈRIES	II
ÍNDIX DE FIGURES	IV
ÍNDIX DE TAULES	VI
RESUM	VII
MOTS CLAU	IX
SIGLES I ABREVIATURES	X
1 INTRODUCCIÓ	1
1.1 EL FOC BACTERIÀ	1
1.1.1 Distribució mundial i història de la malaltia	1
1.1.2 Importància econòmica	2
1.1.3 Agent patogen: <i>Erwinia amylovora</i>	3
1.1.4 Epidemiologia	5
1.1.5 El cicle de la malaltia	6
1.2 MÈTODES ACTUALS DE CONTROL DEL FOC BACTERIÀ	6
1.2.1 Control químic	6
1.2.2 Control biotecnològic	7
1.2.3 Termoteràpia	7
1.2.4 Varietats transgèniques	8
1.2.5 Biocontrol	8
1.3 Antecedents del treball	9
1.4 OBJECTIUS	11
2 MATERIAL I MÈTODES	12
2.1 COMPOSICIÓ DELS MEDIS DE CULTIU	12
2.2 AGENTS DE BIOCONTROL	13
2.2.1 Soques de bacteris de l'àcid làctic	13
2.2.2 Altres agents plaguicides de control	18
2.3 Material Vegetal	19
2.4 PATOGEN: <i>Erwinia amylovora</i>	20

2.5	BIOASSAJOS PER SELECCIONAR SOQUES BAL EFICACES EN EL CONTROL D' <i>E. amylovora</i>	21
2.5.1	Assaig d'eficàcia en fulles	22
2.5.2	Assaig d'eficàcia en flors	26
2.5.3	Assaig d'eficàcia en planta perera en contenidor	27
2.6	SUPERVIVÈNCIA DE BAL EN FLORS de pomera i perera	29
3	RESULTATS I DISCUSSIÓ	31
4	CONCLUSIONS	44
5	BIBLIOGRAFIA	45

ÍNDIX DE FIGURES

<i>Figura 1.1 Síntomes característics del foc bacterià. A: totalitat d'un camp infectat per la malaltia, B, brot i fulles de pomera necrosades i pansides per la infecció, C: fulles amb símptomes d'infecció, D: Detall d'un tronc amb xancre, E: flors pansides i negres a causa de la malaltia, E: fruit afectat amb presència d'exsudats</i>	4
<i>Figura 2.1 Plantes de perera de la varietat Conference, seleccionades amb tres brots i preparades per a la realització de l'assaig, dins l'espai d'hivernacles del CIDSAV de la Universitat de Girona.</i>	20
<i>Figura 2.2 Placa de medi LB amb la soca virulenta EPS101 d'E. amylovora sembrada</i>	21
<i>Figura 2.3 Procediment de neteja de les fulles. Cubells amb aigua, solució de lleixiu al 5% i aigua destil·lada.</i>	22
<i>Figura 2.4 Realització de les ferides a les fulles: al nervi de la fulla i a un terç de la dimensió de la fulla respecte a la part basal.</i>	23
<i>Figura 2.5 Tractaments de les fulles amb BALs per immersió utilitzant unes pinces prèviament desinfectades.</i>	24
<i>Figura 2.6 Caixes utilitzades per col·locar les fulles tractades amb BALs</i>	24
<i>Figura 2.7. Índexs de severitat de la infecció d'E. amylovora en les fulles. (0, absència de símptomes; 1, necrosi al nervi de la fulla, al voltant de la ferida; 2, necrosi al nervi i als extrems de la fulla; 3, progressió de la necrosi a tota la superfície de la fulla).</i>	25
<i>Figura 2.8 Inoculació de la suspensió d'E. amylovora a una concentració de 107ufc/ml.</i>	27
<i>Figura 2.9 Tractaments de BALs de les plantes de perera per pulverització.</i>	28
<i>Figura 3.1 Síntomes de la infecció provocats per E. amylovora en fulles que es van tractar amb estreptomicina, les soques EPS62e, PM340, CM356, PM357 i el control no tractat respectivament.</i>	36
<i>Figura 3.2a Incidència de les infeccions per foc bacterià en fulles (○), fruits immadurs (Δ) i flors (□) de perer Passe Crassane preventivament tractades amb soques de L. plantarum, amb comparació amb el control no tractat. Les soques amb símbols negres van mostrar nivells d'infecció significativament diferents (P<0,01) als controls no tractats en els dos experiments portats a terme en cada òrgan de la planta. Les soques estan agrupades en relació a la seva capacitat de protecció de les infeccions en fulles (A), fruits immadurs (B), flors (C), fruits immadurs i flors (D), fulles i fruits immadurs (E), fulles i flors (F) i als tres òrgans simultàniament (G). 3.2b Soques de</i>	

BAL amb les que s'obté una reducció significativa ($P < 0.05$) de les infeccions per *E. amylovora* respecte el control no tractat en assajos *ex vivo* realitzats en flors, fulles i fruits immadurs, simultàniament en dos experiments realitzats. Les soques remarcades amb negreta són les que es van seleccionar per posteriors experiments. 37-38

Figura 3.3 Efecte dels tractaments amb soques de *L. plantarum* (barres blanques) en les infeccions d'*E. amylovora* en flors de perera *Passe Crassane* i de pomera *Golden*. Els tractaments amb BALs es van comparar amb estreptomycina (barres ratllades), ACB de referència (barres grises) i un control no tractat (barres negres). Les flors es van tractar i posteriorment es van inocular amb *E. amylovora* a 1×10^7 UFC mL^{-1} . Els valors són la mitjana de tres rèpliques. Les barres d'error representen el interval de confiança de la mitjana (95 %). Les barres amb la mateixa lletra de cada figura no difereixen significativament ($P < 0.05$) segons el test de Waller-Duncan. 39

Figura 3.4 Síntomes de la infecció provocats per *E. amylovora* en flors que no tractades 39

Figura 3.5 Efecte dels tractaments amb soques de *L. plantarum* (barres blanques) en les infeccions d'*E. amylovora* en plantes de perera *Conference* comparats amb estreptomycina (barres ratllades), ACB de referència (barres grises) i un control no tractat (barres negres). Es van realitzar ferides a les fulles, es van tractar, i les ferides es van inocular amb *E. amylovora* a 1×10^6 UFC mL^{-1} . Les plantes inoculades es van incubar durant 8 dies en condicions ambientals controlades. Es van realitzar dos experiments independents. Els valors són la mitjana de tres rèpliques. Les barres d'error representen el interval de confiança de la mitjana (95 %). Les barres amb la mateixa lletra de cada figura no difereixen significativament ($P < 0.05$) segons el test de Waller-Duncan. 41

Figura 3.6 Síntomes de la infecció provocada per *E. amylovora* en les plantes. 42

Figura 3.7 Creixement i supervivència de les soques de *L. plantarum* TC54 (●), TC92 (○) i PM411 (▼) en flors de perera '*Passe Crassane*' i de pomera '*Golden*', a humitat relativa elevada (90%) i baixa (50%). Els valors són les mitjanes de tres rèpliques. Les barres d'error representen els intervals de confiança de les mitjanes (95%). 43

ÍNDEX DE TAULES

<i>Taula 2.1 Característiques de les 100 soques de BAL utilitzades (Suriñach, 2011).</i>	13
<i>Taula 2.2 Productes plaguicides de referència utilitzats (bioplaguicides i antibiòtic); producte comercial, si s'escau; concentracions corresponents utilitzades en els assajos d'eficàcia</i>	18
<i>Taula 3.2 Efecte del tractament amb 100 soques de BAL, 4 agents de biocontrol, un tractament amb estreptomina i un control no tractat (H₂O) en la severitat de la infecció causada per E. amylovora als 13 dies de la inoculació de les fulles de perer de la varietat Passe Crassane.</i>	33

RESUM

El foc bacterià és una malaltia de quarantena a la Unió Europea causada pel bacteri *Erwinia amylovora*. Aquesta malaltia afecta fonamentalment a plantes de la família de les Rosàcies, en la que s'inclouen arbres fruiters de gran interès econòmic i diverses espècies ornamentals i silvestres.

Els mètodes disponibles pel control del foc bacterià es limiten a tractaments amb productes químics combinats amb pràctiques culturals. A la Unió Europea, hi ha pocs productes basats en compostos químics autoritzats i els disponibles tenen una eficàcia reduïda i es restringeixen pràcticament als derivats del coure. Degut a aquesta limitació existeix la necessitat de continuar investigant i estudiar estratègies alternatives o complementàries a l'ús de productes químics pel control d'aquesta malaltia.

Aquest treball de fi de carrera s'inclou dins el grup de patologia vegetal de l'INTEA-CIDSAV (Institut de Tecnologia Alimentària - Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal) de la Universitat de Girona i s'emmarca dins el projecte d'investigació de control biotecnològic del foc bacterià. Aquest projecte té com a objectiu obtenir soques de bacteris de l'àcid làctic, amb activitat antibacteriana per a ser utilitzades com a agents de control biològic. El treball es centra principalment en la determinació *ex vivo* (sobre teixit biològic però fora de l'organisme en condicions naturals) i *in vivo* (sobre l'organisme viu) de l'eficàcia de diferents soques de bacteris de l'àcid làctic pel control de la infecció causada per *E. amylovora*; i en l'avaluació de la capacitat de supervivència i colonització dels bacteris de l'àcid làctic en material vegetal.

De les soques de bacteris de l'àcid làctic estudiades, es seleccionen les més eficaces pel control de la infecció per *E. amylovora* en fulla.

Les soques de BAL no mantenen el mateix nivell d'eficàcia en el control d'*E. amylovora* pels diferents òrgans de la planta (fruits immadurs, fulles i flors); es determinen quines són les més eficaces en tots tres òrgans.

D'altra banda, es comprova que les soques de BAL estudiades poden colonitzar i sobreviure en la superfície de flors de perera i pomera; colonitzen a humitat relativa alta (90%) i sobreviuen a humitat relativa baixa (50%).

Les tres soques de *L. plantarum* PM411, TC92 i TC54, van resultar efectives en la prevenció de la infecció *in vivo* en plantes de perera en contenidor. Aquestes soques són candidates apropiades per a un futur desenvolupament d'agents de biocontrol per la seva gran capacitat de colonització d'hostes.

Els resultats obtinguts en la realització d'aquesta experimentació es sumen als obtinguts al llarg de la investigació del grup de recerca CIDSAV amb el propòsit de construir alternatives viables de biocontrol del foc bacterià.

MOTS CLAU

Control biològic

Bacteris de l'àcid làctic (BAL)

Erwinia amylovora

Foc bacterià

SIGLES I ABREVIATURES

ABC: Agent de biocontrol

AMP20017: Soca bacteriana *Bacillus subtilis*

BAL: Bacteris de l'àcid làctic

C9-1: Soca bacteriana *Pantoea vagans*

CIDSAV: Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal

EA: *Erwinia amylovora*

EE.UU: Estats Units d'Amèrica

EFSA: European Food Safety

EPS101: Escola politècnica superior *Erwinia amylovora* soca 101

EPS62e: Escola politècnica superior *Pseudomonas fluorescens* soca 62e

HR: Humitat Relativa

INTEA: Institut de Tecnologia Alimentària

KB: medi de cultiu B de King *et al.*

LB: Medi de cultiu Luria Bertani

LSD: Diferència mínima significativa

MRS: Medi de cultiu Man - Rogosa – Sharpe

Nm: Nanòmetres

N/P/K: fertilitzant amb nitrogen, fòsfor i potassi

p/v: Relació pes volum

QPS: Qualified Presumption of Safety

QST713: Soca bacteriana *Bacillus subtilis*

Spp: espècies de bacteris del mateix gènere

TSA: medi de cultiu Tryptic Soy Agar

UdG: Universitat de Girona

UE: Unió Europea

Ufc: Unitats formadores de colònies

ufc/ml: Unitats formadores de colònies per mil·lilitre

v/v: Relació volum/volum

1 INTRODUCCIÓ

1.1 EL FOC BACTERIÀ

El foc bacterià és una malaltia causada pel bacteri *Erwinia amylovora* (Burril Winslow *et al.*), considerada com a organisme nociu de quarantena a la Unió Europea. Les soques patògenes de la malaltia afecten fonamentalment a plantes de la família de les rosàcies; els gèneres afectats corresponen principalment a la subfamília Maloideae (Pomoideae), dins la qual s'hi inclouen fruiters de llavor (perer, pomera i codonyer), nesprers i diverses espècies ornamentals o silvestres de gran interès econòmic (*Crataegus*, *Cotoneaster*, *Pyracantha*, *Sorbus*, etc.) (López *et al.*, 1987, 1996; van der Zwet y Beer, 1995; López i Montesinos, 1996; Montesinos i López, 2000; Beer 2002).

A l'actualitat, agricultors i científics coincideixen en considerar el foc bacterià com a malaltia única per varies raons: els seus efectes devastadors amb un elevat impacte econòmic; la ràpida migració de la planta, fent-la capaç de destruir arbres de varietats sensibles en períodes vegetatius; la gran capacitat del bacteri de disseminació per diferents medis i de sobreviure en els teixits de les plantes hostes; el rang limitat d'hostes i, tot i ser una de les malalties bacterianes més estudiades, el desconeixement de mètodes eficaços per a la lluita contra aquesta.

1.1.1 Distribució mundial i història de la malaltia

El foc bacterià es va descriure per primera vegada al 1780 a l'estat de Nova York (EE.UU.) (Burril, 1883; Winslow *et al.*, 1920) i es va estendre posteriorment al Canadà i a altres estats de la zona atlàntica, així com a la costa del Pacífic. La malaltia es va detectar a Nova Zelanda al 1919, a Europa al sud d'Anglaterra al 1957 i al 1964 a Àfrica. A partir d'aquest moment, la malaltia s'ha propagat a Europa i actualment afecta a la major part dels països europeus i del Mediterrani occidental (Cabrefiga, 2004; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009).

A Espanya es va detectar per primera vegada el 1995 a Lezo (Guipúzcoa), a 10 km de la frontera amb França en unes pomeres de sidra (Butrón, 1995). Posteriorment, altres zones de l'Estat han estat infectades i en diverses zones on no ha estat possible la eradicació de la malaltia, s'ha declarat com a oficialment establerta i han deixat de ser zones protegides. És el

cas d'Aragó on, des del 2011, han aparegut diversos focus de la malaltia en plantacions de fruiters.

A Catalunya, els primers focus d'aquesta malaltia van ser detectats al Segrià els anys 1998 i 1999. El 2003 i el 2006 es van detectar dos nous focus a la Cerdanya i al 2007 en plantacions de perers a la comarca del Gironès. Tots aquests focus van ser correctament eradicats gràcies a les mesures de prevenció establertes pel Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural amb la qual cosa Catalunya es va mantenir com a zona protegida de la malaltia. Durant els mesos de maig i juny del 2013, es van detectar nous focus en diverses plantacions de perers en diversos municipis del Segrià i, durant el mateix mes de juliol, en plantacions de pomeres a Girona. La Generalitat de Catalunya va apostar per la prospecció intensiva dels fruiters de llavor per a la detecció precoç dels focus, així com l'arrencada i la crema immediata de les plantes afectades. Recentment, s'han detectat diversos focus a les comarques del Segrià i la Noguera, així com al municipi de Torroella de Montgrí, al Baix Empordà. Amb la detecció d'aquests focus i segons la normativa vigent, s'han establert zones de seguretat dins les quals és obligatori executar determinades mesures al llarg dels pròxims dos anys fins al novembre del 2015. (Cabrefiga, 2004; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009; Generalitat de Catalunya, 2013; RuralCat, 2013).

Segons dades de l'any 2007 de la *Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes/European and Mediterranean Plant Protection Organisation* (OEPP/EPPO) encara romanen lliures de foc bacterià zones fructícoles de l'hemisferi sud: Sud-àfrica, Xile, Argentina i Brasil així com Austràlia. No hi ha cites de la seva existència en cap país d'Amèrica del Sud, Àfrica (exceptuant Egipte i Marroc), Xina i Japó.

1.1.2 Importància econòmica

El foc bacterià és una malaltia d'importància econòmica per varies raons: afecta a espècies de gran interès comercial, és altament contagiosa i per tant de ràpida expansió i no existeixen mètodes eficaços per al seu control. Els danys econòmics estan lligats principalment a la ràpida expansió de la malaltia.

En condicions climàtiques favorables al bacteri i en espècies vegetals molt sensibles, la producció es redueix considerablement i en alguns casos pot arribar a ser pràcticament nul·la.

Una altra particularitat del foc bacterià és que no només és destructiu per a la collita de l'any en curs, sinó que també per a les pròpies plantes. La mort de les gemmes de flor, branques i

arbres enters de les varietats sensibles en pocs mesos, pot comprometre la producció en anys posteriors.

La mort progressiva dels arbres de varietats sensibles afecta a la producció, modificant l'estructura varietal dels sectors fructícolas i incrementant els costos de producció. En algunes zones d'Estats Units i Europa, el cultiu del perer ha estat abandonat a causa d'aquesta malaltia. A França, la producció de pera i poma, obligada a conviure amb la malaltia, ha hagut de sofrir una reconversió varietal, arribant inclús a la desaparició del cultiu de pera en les zones més afectades. La presència de la malaltia ha imposat una selecció entre les varietats cultivades, ja que en la majoria de les regions franceses no és possible una producció comercial normal i prolongada d'aquelles varietats especialment sensibles (Paulin, 1999).

Resulta difícil l'obtenció de xifres econòmiques que detallin les pèrdues causades anualment pel foc bacterià, però se sap que aquestes són molt elevades (van der Zwet i Keil, 1979). A més a més de les pèrdues directes en la collita, s'han d'incloure els costos de l'adopció de mesures de control i el cost que comporta l'obligada modificació de l'estructura varietal del sector fructícol.

El foc bacterià també té conseqüències negatives per al sector viverista: la prohibició d'exportació a països lliures de la malaltia origina pèrdues econòmiques indirectes (Hale *et al.*, 1996). Així mateix, l'exportació de fruits també es pot veure afectada, ja que existeixen països lliures de foc bacterià com el Japó i Austràlia, que imposen enormes restriccions a la importació de fruits procedents de països en que la malaltia és present com EE.UU i Nova Zelanda.

1.1.3 Agent patògen: *Erwinia amylovora*

L'*E. amylovora* és un bacteri gram negatiu, pertanyent a la família de les enterobacteriàcies, anaerobi facultatiu, bacil·lar, de flagel·lació períttrica i no formador d'espores.

La infecció d'*E. amylovora* pot iniciar-se en plantes de qualsevol edat i afecta a la totalitat dels òrgans de la planta. L'hoste afectat, presenta un aspecte cremat, característica que dona nom a la malaltia "foc bacterià" (figura 1.1). A excepció de petits detalls, els símptomes del foc bacterià són similars en totes les espècies d'hostes. Depenent del moment de la observació és possible apreciar uns o altres símptomes i no tots els símptomes s'observen simultàniament en una mateixa planta.

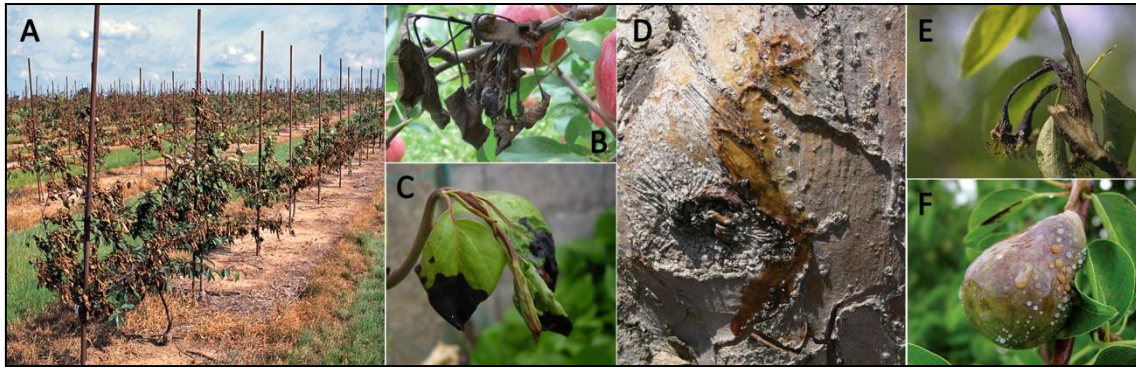


Figura 1.1 Síntomes característics del foc bacterià. A: totalitat d'un camp infectat per la malaltia, B, brot i fulles de pomera necrosades i pansides per la infecció, C: fulles amb símptomes d'infecció, D: Detall d'un tronc amb xancre, E: flors pansides i negres a causa de la malaltia, F: fruit afectat amb presència d'exsudats

Els primers símptomes tendeixen a presentar-se a la primavera durant la floració i brotació i es localitzen amb freqüència a la zona mitja o baixa de l'arbre, tant a la perifèria com a l'interior de la copa. Les flors, brots i fruits joves, són els òrgans més sensibles de la planta i on s'inicien les infeccions. Si les condicions són favorables, el bacteri avança de forma sistemàtica i la infecció progressa a gran velocitat cap a les fulles, branques secundàries i principals, el tronc i inclús a les arrels.

A les flors, *E. amylovora* penetra a través d'obertures naturals que inclouen els estigmes, anteres i estomes dels sèpals nectaris. Es multiplica principalment a l'estigma (Rosen, 1935; Hildebrand, 1937), En les fases inicials de la infecció, les flors presenten un aspecte humit, posteriorment espanseixen i adquireixen una coloració marró o negre i finalment, moren. Les flors necrosades resten a l'arbre. El bacteri es multiplica i la infecció avança cap al peduncle floral, que també apareix ennegrit, arribant finalment a les branques.

En el cas dels brots, les infeccions són possibles tant en la brotació com en aquelles fases en les que hi té lloc la formació i creixement de brots herbacis. Es pot apreciar un enfosquiment dels brots, que mostren una pèrdua de la rigidesa i es corben d'una forma característica que es coneix amb el nom de "gaita del pastor". En els teixits subepidèrmics del brot, es poden observar estries de color vermellós i aspecte humit.

Les fulles poden ser infectades a partir del brot en el que estan situades o bé per penetració directa del bacteri a través de les seves ferides. El símptoma inicialment visible pot ser un pansiment, que pot anar acompanyat de taques necròtiques en els marges i a la superfície de la fulla.

Els fruits poden veure's afectats des del principi de la seva formació fins a la maduresa. El bacteri penetra a través de les lenticel·les o ferides. Els fruits afectats presenten inicialment un aspecte humit i més tard s'enfosqueixen produint-se la necrosi. A l'interior, es poden observar zones d'aspecte vitri i humit. Finalment, els fruits queden momificats a l'arbre i cauen.

Al final del cicle de la infecció es produeix la formació de xancre que són els reservoris que permeten la supervivència a l'*E. amylovora* quan les condicions ambientals no són favorables. Aquests xancre, apareixen als brots i al tronc dels arbres.

Tot i que no són les més freqüents, poden aparèixer infeccions al coll i arrels de les plantes afectades; quan tenen lloc, es produeix una mort de l'individu afectat de manera molt ràpida.

Una peculiaritat de l'*E. amylovora* és la capacitat de producció d'exsudats bacterians en qualsevol dels òrgans afectats; aquests exsudats es presenten en forma de gotes i/o filaments mucilaginosos de color blanquinós o groguenc. L'aparició d'exsudats és deguda a la producció d'exopolisacàrids per part del patogen o com a reacció de defensa de la planta. Estan formats per gran número de cèl·lules bacterianes protegides per mucopolisacàrids i constitueixen una important font d'inòcul i faciliten la dispersió del bacteri.

Les fases inicials de la infecció, poden confondre's amb altres símptomes produïts per atac d'altres bacteris (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia piriflorinigrans*, *Erwinia pyrifoliae*, "bacterial shoot blight of pear" descrit al Japó i amb agent causal una altra bactèria del gènere *Erwinia*), fongs (*Nectria* spp., *Phomopsis* spp., *Phytophthora* spp.), plagues (*Janus compressus*, larves de *Zeuzera pyrina*) o diverses alteracions fisiològiques (carències de bor, tractaments amb herbicides, etc). (Balduque *et al.*, 1996, 1998; Rosselló *et al.*, 2002, 2006, 2008; Kim *et al.*, 1999, 2001; Tanii *et al.*, 1981; Rhim *et al.*, 1999; Goto, 1992; Maxson-Stein *et al.*, 2003).

1.1.4 Epidemiologia

El foc bacterià és una de les malalties amb major capacitat de disseminació a curtes i llargues distàncies i per mètodes biòtics i abiòtics. A curta o mitjana distància té lloc mitjançant la pluja, el vent, els insectes i a través de la maquinària i eines de poda. A llarga distància, té lloc mitjançant el transport de material vegetal amb o sense els símptomes i, probablement també per les aus migratòries. No obstant, no s'ha pogut relacionar sempre la disseminació de la malaltia als vectors anteriors, el que suggereix que *E. amylovora* també es podria dispersar a través de medis encara no identificats.

Entre els factors condicionants de la malaltia, es poden destacar la quantitat d'inòcul disponible (existència pròxima del bacteri i presència d'exsudats), els factors que condicionen la receptivitat i la sensibilitat de la planta hoste (sensibilitat varietal, estat vegetatiu, vigor del terra i fertilització i plagues) i les condicions climàtiques (temperatura, humitat, pluja, pedregades, gelades i vent).

1.1.5 El cicle de la malaltia

El desenvolupament del foc bacterià està associat al desenvolupament estacional de la planta hoste: es considera que el cicle comença a la primavera amb la producció de l'inòcul primari present en els xancre (cèl·lules d'*E. amylovora* que serveixen per iniciar les primeres infeccions en període vegetatiu) i la infecció de les flors, continua durant l'estiu amb la infecció de brots i/o fruits i finalitza a finals d'estiu o principis de tardor amb la formació de xancre. El patogen roman latent durant el període de repòs vegetatiu de l'hoste. Un cop ha tingut lloc la infecció primària i el patogen ha avançat a través dels teixits, es produeixen grans quantitats d'inòcul secundari que serà disseminat mitjançant diferents agent biòtics o abiòtics descrits anteriorment, donant a lloc noves infeccions. (Palacio-Bielsa *et al.*, 2009).

1.2 MÈTODES ACTUALS DE CONTROL DEL FOC BACTERIÀ

Amb la manca de mètodes de control de la malaltia eficaços, les mesures més efectives per al control del foc bacterià, són les preventives. Consisteixen en l'ús de material vegetal sa i en la plantació d'espècies i varietats hostes poc sensibles a la malaltia. Aquestes es complementen amb l'ús del passaport fitosanitari, eina molt eficaç per a minimitzar el risc d'introducció del foc bacterià; la realització d'inspeccions periòdiques durant la primavera, estiu i tardor; i l'avis a les serveis competents davant de qualsevol símptoma sospitós.

Un cop la malaltia s'ha introduït i establert en una regió, tan sols és possible utilitzar mesures de convivència per a evitar els seus efectes.

1.2.1 Control químic

Els productes disponibles per al control del foc bacterià són molt limitats i depenen en gran mesura del tipus de cultiu a protegir i de la legislació vigent en cada país. Recentment s'ha prohibit la utilització de molts plaguicides químics dins el marc de la Unió Europea. En el tractament del foc bacterià, els mètodes de control químic existents són pocs i en general, poc eficaços. S'apliquen amb la finalitat d'evitar la colonització de la planta per part del patogen,

no existeixen tractaments curatius (López i Montesinos, 1996). Dels productes químics provats, els més eficaços són els compostos cúprics i els antibiòtics.

Els productes cúprics es basen en l'alliberació de ió coure, d'efecte microbiocida. Presenten un inconvenient de fitotoxicitat a mesura que els tractaments s'acosten a la floració. Estan autoritzats en fruiters de fulla caduca.

Els antibiòtics, tenen un efecte directe, ja que inhibeixen la multiplicació d'*E. amylovora*. Aquests, no estan autoritzats per la legislació de la Unió Europea (UE). A Estats Units està permesa la utilització de l'estreptomocina i tetraciclina.

Existeixen també una sèrie de matèries actives que no presenten una acció inhibidora directa sobre el bacteri, però certa activitat en el control del foc bacterià: fosetil-Al, prohexadiona de calci, enzotiadiazol i harpines (Montesinos *et al.*, 2002; Norelli i Miller, 2004).

1.2.2 Control biotecnològic

Per al control biotecnològic, s'han estudiat metabòlits produïts per microorganismes antagonistes a l'*E. amylovora*, extractes de plantes o pèptids antimicrobians sintètics. Alguns d'aquests pèptids, dissenyats basant-se en pèptids antimicrobians naturals, tenen una eficàcia per al control del foc bacterià en condicions d'ambient controlat comparable amb els antibiòtics, tot i no haver-se realitzat encara assajos a camp. Es tracta d'undecaèptids lineals i ciclodecapèptids dissenyats específicament basant-se en pèptids antimicrobians naturals presents en les plantes, animals o microorganismes (Ferré, *et al.*, 2006; Monroc *et al.*, 2006 a, b; Badosa *et al.*, 2007).

1.2.3 Termoteràpia

La tècnica de la termoteràpia, s'ha aplicat a plantons de fruiters i plantes ornamentals; consisteix en l'aplicació de calor sec a 45°C durant 60 minuts, disminuint molt significativament la població de la soca avirulenta de la *E. amylovora* inoculada artificialment (Ruz *et al.*, 2003).

Aquesta tècnica és experimental i s'ha de realitzar amb molta cura per tal de no produir danys irreversibles al material vegetal.

1.2.4 Varietats transgèniques

De la mateixa manera que amb moltes altres malalties, s'ha plantejat el desenvolupament de varietats transgèniques de perer i pomera: introducció i sobreexpressió de gens que codifiquen per a la síntesi de pèptids-proteïnes antimicrobianes com l'actina i la liozima, depolimerasses de bacteriòfags i harpines que estimulen la resposta defensiva de l'hoste; s'han obtingut varietats de pomera i perer amb nivells de resistència al foc bacterià significatives. Cap d'aquestes varietats està disponible al mercat ni autoritzada a Europa.

1.2.5 Biocontrol

Com a mètode complementari al control químic, s'utilitzen mètodes de control biològic basats en bacteris antagonistes o competidors de l'*E. amylovora*. Els bacteris més utilitzats són algunes soques de *Pantoea agglomerans*, *Pseudonas fluorescens* i *Bacillus subtilis*.

L'objecte d'estudi d'aquest treball són els mètodes de control biològic amb bacteris de l'àcid làctic (BAL). En aquest moment no hi ha productes al mercat relacionats amb bacteris de l'àcid làctic.

Els productes biològics, són més efectius quan s'apliquen durant la floració ja que la seva activitat es basa en impedir la infecció-colonització de flors i les estructures joves i tendres per *E. amylovora*. Les dosis d'aplicació efectives es troben entre 10^7 i 10^8 ufc/ml. També és durant la floració quan la majoria de productes químics resulten més fitotòxics i per tant no es poden aplicar i el control biològic té més sentit (Palacio-Bielsa *et al.*, 2009).

El control biològic es presenta amb bones expectatives de cara al futur com a alternativa més sostenible, que els mètodes de control convencionals, per al control foc bacterià. Tot i això, el control biològic encara presenta certa inconsistència pel que fa a l'eficàcia, a la limitada supervivència de l'agent de control biològic i a la baixa competitivitat respecte altres mètodes químics. S'està estudiant com solventar-ho mitjançant la cerca d'un efecte sinèrgic bactericida combinant diferents soques, a través de la millora fisiològica, és a dir, utilitzant mètodes d'osmoadaptació que permetin que el bacteri s'adapti fàcilment al medi que l'envolta i formulacions adequades que ajudin a optimitzar les característiques del bacteri (Bonaterra *et al.*, 2007).

1.3 Antecedents del treball

Al Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal (CIDSAV) de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA) de la Universitat de Girona, es va reunir una col·lecció d'aproximadament 500 aïllats de bacteris de l'àcid làctic obtinguda de fruites i hortalisses mínimament processades. Es va avaluar la seva eficàcia com a agents de control contra fongs i bacteris deteriorants de fruites i hortalisses mínimament processades; es van seleccionar diverses soques, la majoria de les quals del gènere *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Weissella* amb activitat significativa per a la reducció de *Listeria monocytogenes* en pomes i enciam processat; es van seleccionar altres soques de la mateixa col·lecció efectives en la inhibició de podridures fúngiques de post-collita en pomes causades per *Penicillium expansum*.

Posteriorment, es va confeccionar una nova col·lecció de 100 soques aïllades de 180 mostres vegetals (fruits madurs i immadurs i flors) i es van seleccionar com a bacteris de l'àcid làctic (Trias *et al.*, 2008^a; Montesinos *et al.*, 2009b; Suriñach, 2011).

Es va dur a terme una selecció assistida, amb marcadors moleculars, de les soques de BAL de totes dues col·leccions amb la finalitat de determinar si les soques aïllades, presentaven els gens que codifiquen per diferents bacteriocines (la nisina, la mesentericina i la plantericina) i es va determinar el possible antagonisme *in vitro* de les soques de BAL davant *E. amylovora* i altres indicadors, com bacteris fitopatògens.

D'aquesta primera etapa de selecció, en van resultar 100 soques de bacteris de l'àcid làctic de les gairebé 600 inicials. Es van optimitzar un mètodes de bioassaig *ex vivo* d'eficàcia en el control d'*E. amylovora* que van permetre avaluar simultàniament el nombre elevat de soques en material vegetal (flors, fulles i fruits immadurs de perer de la varietat Passe Crassane) (Cabrefiga, 2004; Daranas, 2011).

És en aquest en aquest punt que s'inicia desenvolupament d'aquest projecte de fi de carrera, en el que es realitza un segon assaig d'eficàcia en fulles per tal de contrastar resultats de les 100 soques de BAL utilitzant el mètode de bioassaig optimitzat (Daranas, 2011).

De tots els assajos d'eficàcia realitzats fins al moment; se'n seleccionen les soques més eficaces en més d'un òrgan (flors, fruits i fulles). Amb aquestes soques es realitzen un assaig d'eficàcia i un assaig de supervivència dels BAL en flors de perera de la varietat Golden Delicious i pererer de la varietat Passe Crassane. Per últim, es realitza un assaig d'eficàcia *in*

vivo en planta perera de la varietat Conference, de les 3 soques de BAL amb millors resultats en assajos anteriors.

Paral·lelament a la realització d'aquest treball de fi de carrera, es realitzen estudis per tal de determinar l'activitat antibacteriana en els sobrenedants de les suspensions de BALs; la incidència de la temperatura en la cinètica de creixement de cultius de la soca PM411 en MRS i en l'activitat antibacteriana dels cultius; la incidència de la composició del medi de cultiu en la cinètica de creixement de la soca PM411 i enfront l'activitat antibacteriana del sobrenadant; la fitotoxicitat dels sobrenedants lliures de cèl·lules dels cultius de PM411 en medi MRS (Mercader, 2012).

1.4 OBJECTIUS

Els principals objectius d'aquest projecte de recerca són els següents:

1. Determinar l'eficàcia dels bacteris de l'àcid làctic en el control de la infecció causada per *E. amylovora ex vivo* en fulles i flors; i *in vivo* en plantes.
2. Determinar la capacitat de supervivència i colonització dels bacteris de l'àcid làctic en material vegetal, concretament en flors.

2 MATERIAL I MÈTODES

2.1 COMPOSICIÓ DELS MEDIS DE CULTIU

Agar Man - Rogosa - Sharpe (MRS) (Panreac, Barcelona, Espanya)

20 g/l de glucosa ($C_6H_{12}O_6$), 10 g/l de peptona, 10 g/l d'agar, 8 g/l d'extracte de carn, 5 g/l d'acetat de sodi ($C_2H_3NaO_2$) · 3H₂O, 4 g/l d'extracte de llevat, 2 g/l de citrat d'amoni ($C_6H_{17}N_3O_7$), 2 g/l de difosfat de potassi (K_2HPO_4), 1 ml de sorbitan monooleat, 0.2 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ i 0.05 g/l de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$.

Agar MRS + rifampicina

50 mg/l de rifampicina (Sigma, Saint Louis, USA) dissolts en 400 µl de metanol i 10mg/l Econazol (Sigma) dissolts en 100 µl de metanol.

Agar Luria Bertani (LB)

15 g/l d'agar (Oxoid), 10 g/l de triptona (Oxoid, Hampshire, UK), 10 g/l de NaCl (Merck, Darmstadt, Alemanya) i 5 g/l d'extracte de llevat (Oxoid).

Agar MRS + nalidíxic

50 mg/l de d'àcid nalidíxic (Sigma, Saint Louis, USA) dissolts en 400 µl de cloroform i 10mg/l Econazol (Sigma) dissolts en 100 µl de metanol.

2.2 AGENTS DE BIOCONTROL

2.2.1 Soques de bacteris de l'àcid làctic

Es van emprar com a agents de biocontrol 100 soques diferents de bacteris de l'àcid làctic procedents de mostres vegetals fresques o mínimament processades d'ambients naturals i mercats minoristes. A la taula 2.1 es mostren les característiques d'aquestes soques determinades en estudis previs realitzats al grup de recerca CIDSAV-Patologia Vegetal de l'INTEA (UdG). Aquestes característiques són l'antagonisme *in vitro* en medi LBP i MRS enfront *E. amylovora* i altres indicadors com *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudomonas syringae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*; presència dels gens que codifiquen per a les bacteriocines plantericina, nisina i mesentericina; eficàcia significativa en el control d'*E. amylovora* en flor i fruit; i l'origen a partir del qual es va aïllar la soca (Suriñach, 2011).

Taula 2.1 Característiques de les 100 soques de BAL utilitzades (Suriñach, 2011).

Codi soca	Antagonisme <i>in vitro</i>		Marcadors moleculars			Eficàcia bioassaig		Origen
	En medi LBP	En medi MRS	PLAN	NIS	MES	Flor	Fruit	
MC5	+	+	-	-	+	-	-	maduixa Bàscara
EM16	-	+	-	-	-	-	-	enciam iceberg Bonpreu
BC24	-	+	+	-	-	-	+	Bleda Madremanya
PC25	-	+	-	-	-	-	-	patata Madremanya
TC28	-	+	+	-	-	-	-	tomata Madremanya
PC29	-	+	+	-	-	-	+	patata Madremanya
BC30	-	+	+	-	-	-	-	bleda Madremanya
CC31	-	+	+	-	-	-	-	cogombre Madremanya
CC32	-	-	+	-	+	-	-	col Madremanya
TC35	+	+	+	-	-	+	-	tomata Bàscara
BC37	-	+	+	-	-	-	-	bleda Madremanya
PC40	+	+	+	-	-	+	+	patata Madremanya

(continua)

Codi soca	Antagonisme <i>in vitro</i>		Marcadors moleculars			Eficàcia bioassaig		Origen
	En medi LBP	En medi MRS	PLAN	NIS	MES	Flor	Fruit	
TC41	+	+	+	-	-	-	+	tomata Bàscara
TC44	+	+	+	-	-	-	-	tomata Madremanya
TC46	-	+	+	-	-	-	-	tomata Bàscara
AC47	-	-	-	-	-	-	-	albergínia Madremanya
PC49	-	+	+	-	-	-	-	patata Madremanya
BC50	-	+	+	-	+	-	-	bleda Madremanya
PC52	-	+	-	-	-	-	-	patata Madremanya
TC54	+	+	+	-	-	+	+	tomata Bàscara
AC58	+	+	+	-	+	-	-	albergínia Madremanya
AC59	+	+	+	-	-	-	-	albergínia Madremanya
TC60	-	+	+	-	-	-	+	tomata Madremanya
PC64	-	+	-	-	-	-	-	pebrot groc Madremanya
BC66	+	+	+	-	-	-	-	bleda Madremanya
PC67	+	+	+	-	-	-	-	patata Madremanya
TC69	+	+	+	-	-	-	-	tomata Bàscara
CC70	+	+	+	-	-	-	-	col Madremanya
TC71	+	+	+	-	-	-	-	tomata Bàscara
AC73	-	+	+	-	-	-	+	albergínia Madremanya
CC80	-	-	+	-	-	-	-	col Madremanya
AC81	-	+	+	-	-	-	+	albergínia Madremanya
AC84	-	+	+	-	-	-	-	albergínia Madremanya
TC92	+	+	+	-	-	+	+	tomata Bàscara
CC93	+	+	+	-	-	-	-	col Madremanya
TC97	+	+	+	-	-	-	+	tomata Bàscara

(continua)

Codi soca	Antagonisme <i>in vitro</i>		Marcadors moleculars			Eficàcia bioassaig		Origen
	En medi LBP	En medi MRS	PLAN	NIS	MES	Flor	Fruit	
PC99	+	-	+	-	+	-	-	pebrot groc Madremanya
CC100	-	+	+	-	-	-	-	cogombre Madremanya
TC101	+	+	+	-	-	-	-	tomata Bàscara
TC102	+	+	+	-	+	-	-	tomata Bàscara
TM106	-	-	+	-	-	-	-	tomata verda mercat
TC110	+	+	+	-	-	-	-	tomata Bàscara
CC121	-	+	+	-	-	-	-	cogombre Madremanya
CM135	-	+	-	-	+	-	-	cirera mercat
CM144	-	+	-	-	+	-	-	cirera mercat
CM160	-	+	-	-	+	-	-	cirera mercat
CM165	+	+	-	-	+	-	-	cirera mercat
BC176	+	+	-	-	-	-	-	blat de moro fulla Bàscara
BC184	+	+	-	-	-	-	-	blat de moro fulla Bàscara
BC188	+	+	-	-	-	-	-	blat de moro fulla Bàscara
PC202	+	+	-	-	+	-	-	poma Lleida
CM205	-	+	-	-	+	+	-	cabdells Bonpreu
CM209	-	+	-	-	+	-	+	cabdells Bonpreu
FC212	-	+	-	-	+	-	-	figa Sils
EM214	-	+	-	-	-	-	-	endívia envasada
PC216	+	+	-	-	+	-	-	poma Bàscara
FC248	+	+	+	-	-	-	-	figa Bàscara
PC254	-	+	-	-	+	-	-	poma Bàscara
BM259	-	+	-	-	-	-	-	bròquil envasat Bonpreu

(continua)

Codi soca	Antagonisme <i>in vitro</i>		Marcadors moleculars			Eficàcia bioassaig		Origen
	En medi LBP	En medi MRS	PLAN	NIS	MES	Flor	Fruit	
PC263	+	+	-	-	+	-	-	poma Bàscara
AM266	+	+	-	-	+	+	-	amanida envasada
PM285	-	+	-	-	+	-	-	pebrot Bonpreu
SM303	-	-	-	+	-	-	-	soja envasada
FC306	-	+	+	-	+	-	-	figa Sils
PM314	+	+	+	-	+	-	-	pera decana Champion
AC316	+	+	-	-	-	+	-	albergínia Fornells S.
AC318	+	+	+	-	+	-	-	albergínia Fornells S.
CM338	+	+	+	-	+	-	-	col llombarda Hipercor
PM340	+	+	-	-	-	-	-	pera decana Champion
CM356	+	+	-	-	+	-	-	col llombarda Hipercor
PM357	+	+	-	-	+	-	-	pera ercolini Hipercor
TM358	+	+	-	-	+	+	-	tomata cherry Hipercor
CM359	-	+	-	+	+	-	+	carxofa Champion
PM366	+	-	-	-	+	+	-	préssec Bonpreu
AC367	+	-	-	-	-	-	-	albergínia Fornells S.
PM407	+	+	-	-	-	-	-	préssec Bonpreu
PM411	+	+	+	-	-	+	-	pera decana Champion
CM466	+	+	+	-	-	-	-	caqui Bonpreu
PM490	+	-	-	-	-	-	-	pebrot padró Bonpreu
OC503	+	+	-	-	-	-	-	olivera curivell
GC521	-	+	-	-	-	-	-	gira-sol
RC524	-	+	-	-	-	-	-	romeguera
RC526	+	+	+	-	-	-	-	romeguera

(continua)

Codi soca	Antagonisme <i>in vitro</i>		Marcadors moleculars			Eficàcia bioassaig		Origen
	En medi LBP	En medi MRS	PLAN	NIS	MES	Flor	Fruit	
FC533	+	+	-	-	-	-	-	figuera coll de sra.
FC534	+	+	+	-	-	-	-	figuera paratge
CC555	-	+	-	-	-	-	-	carbassó
FC560	-	-	-	-	-	+	-	figuera
EC562	+	+	-	-	-	-	-	escarola
NC568	+	+	+	-	-	-	-	nesprer
AC569	-	-	-	-	-	-	-	avellaner
CC575	+	+	-	-	-	-	-	colza standing
PC579	-	-	-	-	-	+	-	pomer golden delicious
PC583	-	-	-	-	-	-	-	pomer granny
EC586	+	+	-	-	-	-	-	enciam
OC590	-	+	-	-	-	-	-	olivera curivell
NC591	-	+	-	-	-	-	-	nectarina
CC592	-	+	-	-	-	-	-	vinya jaquers
CC596	+	+	-	-	-	-	-	carbassó
CC597	+	+	-	-	-	-	-	carbassó
CC598	-	+	-	-	-	-	-	carbassó

Nota: PLAN: plantaricina; NIS: nisina i MES: mesentericina

El medi de cultiu que es va utilitzar per al creixement de les soques de BAL a 23°C va ser l'agar MRS. Fins a la seva utilització, les soques de BAL es van conservar en medi MRS i glicerol al 20% en un ultracongelació a - 80 °C (MDF-U51865S, B. Braun Biotech, Sanyo, Japó). Els cultius es van realitzar mitjançant sembra en estria en plaques de medi MRS que es van incubar (Incubador NU-425-60E, Sanyo, Japó) a 27°C durant 48h. Per al seu manteniment fins a la realització de l'assaig, les plaques es van repicar periòdicament.

Per a preparar les suspensions bacterianes utilitzades es van recollir, amb una nansa Kolle, colònies de la superfície d'agar d'un cultiu de 48h i es van suspendre en aigua destil·lada estèril. Es va determinar la concentració de la suspensió mitjançant la determinació de la seva absorbància per espectrofotometria (Espectrofotòmetre Shimadzu UV-VIS, Grams Instrumented, EUA). Com a referència, es va utilitzar que un valor d'absorbància de 0,250 a 600 nm equival a una concentració de 10^8 ufc/ml dels BAL.

2.2.2 Altres agents plaguicides de control

De forma paral·lela als bacteris de l'àcid làctic, es van utilitzar altres agents de biocontrol i un antibiòtic eficaços en el control de l'*E. amylovora* com a tractaments de referència. A la següent taula 2.2 es detallen les característiques dels productes així com les concentracions utilitzades.

Taula 2.2 Productes plaguicides de referència utilitzats (bioplaguicides i antibiòtic); producte comercial, si s'escau; concentracions corresponents utilitzades en els assajos d'eficàcia

Agent de control	Microorganisme	Producte comercial	Concentració utilitzada
EPS62e	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	10^8 ufc/ml
AMP20017	<i>Bacillus subtilis</i>	-	10^8 ufc/ml
C9-1	<i>Pantoea vagans</i>	Blightblan (regirat a Estats Units)	10^8 ufc/ml
QST713	<i>Bacillus subtilis</i>	Serenade®	4 g/l
Estreptomicina	-	-	100 mg/l

P. fluorescens EPS62e es va utilitzar una concentració de 10^8 ufc/ml, obtinguda mitjançant la determinació de l'absorbància per espectrofotometria (Espectrofotòmetre Shimadzu UV-VIS, Grams Instrumented, EUA) prenent com a partida que aquesta concentració equival a una absorbància de 0.3 a 600 nm.

B. subtilis AMP20017 també es va aplicar a una concentració de 10^8 ufc/ml que es va ajustar mitjançant la determinació d'absorbància d'1 a 600 nm.

P. vagans C9-1 es va utilitzar a una concentració de 10^8 ufc/ml ajustada mitjançant la determinació d'una absorbància de 0.4 a 600 nm.

El medi de cultiu que es va utilitzar per al creixement de les soques EPS62e, AMP20017 i C9-1 va ser el LB. Es van incubar a una temperatura de 23°C durant les 48h prèvies a la realització de l'assaig. Per al seu manteniment, les soques es van anar repicant periòdicament.

El producte comercial Serenade® és un fungicida i bactericida biològic preventiu que conté la soca QST713 com a component actiu. La dosi indicada per la casa comercial és de 4 g/l.

L'estreptomicina és un antibiòtic. Per a la realització dels assajos, es va utilitzar en una concentració de 100 mg/l.

2.3 Material Vegetal

Per a la realització dels assajos d'eficàcia dels BAL en fulles, es van utilitzar fulles de perer de la varietat Passe Crassane, procedents de l'espai d'hivernacles del centre de recerca CIDSAV de la Universitat de Girona. Prèvia a la recollida de fulles, es va dur a terme una poda i manteniment de les plantes. De cada perer, es van seleccionar únicament les tres fulles superiors. Es van evitar les fulles lignificades, ennegrides a causa del fred, amb cops o ferides i atacades per plagues i/o fongs. Es van conservar en refrigeració fins a ser manipulades.

Per als assajos d'eficàcia dels BAL en el control de la infecció per *E. amylovora* en planta perera en contenidor, es van utilitzar plantes de perer de la varietat Conference procedents de l'espai d'hivernacles del centre de recerca CIDSAV de la Universitat de Girona. Les plantes es van fer créixer durant tres anys en testos contenidors de 20 cm de diàmetre (figura 2.1). Durant l'hivern, les plantes es van deixar en repòs en fred fóra de l'hivernacle. A principis de primavera, es van podar per tal de deixar tres o quatre brots i es van forçar a florir dins l'hivernacle. Les plantes es van fertilitzar un cop per setmana amb una solució de 200 ppm N/P/K (20:10:20) i se'ls van aplicar insecticides i miticides estàndards.

Les plantes van estar llestes per utilitzar quan els brots van tenir una longitud superior a 10 cm i cinc o sis fulles per brot.



Figura 2.1 Plantes de perera de la varietat Conference, seleccionades amb tres brots i preparades per a la realització de l'assaig, dins l'espai d'hivernacles del CIDSAV de la Universitat de Girona.

Per als assajos d'eficàcia i de supervivència de BALs en flors es van utilitzar flors de pomera de la varietat Golden Delicious i flors de perer de la varietat Passe Crassane procedents d'una finca comercial del terme municipal de Campllong, al Gironès.

2.4 PATOGEN: *Erwinia amylovora*

Per a tots els assajos realitzats, es va utilitzar la soca d'*Erwinia amylovora* EPS101 (Cabrefiga i Montesinos, 2005) com a patogen. Es tracta d'una soca virulenta d'*E. amylovora* aïllada anteriorment d'un brot de perer infectat a Lleida. El medi de cultiu que es va utilitzar pel seu creixement, en incubació a 27°C, va ser agar LB (figura 2.2). La soca es va conservar des del seu aïllament en medi LB i glicerol al 20% i amb ultracongelació a -80°C (MDF-U51865S, B. Braun Biotech, Sanyo, Japó). Per a la seva recuperació, es va realitzar una sembra en estria en una placa amb medi LB i es va incubar (Incubator NU-425-60E, Sanyo, Japó) a 27°C durant 48h. Per al manteniment de la soca durant la realització dels assajos, aquesta es va anar repicant periòdicament, aproximadament cada 48 - 96h.

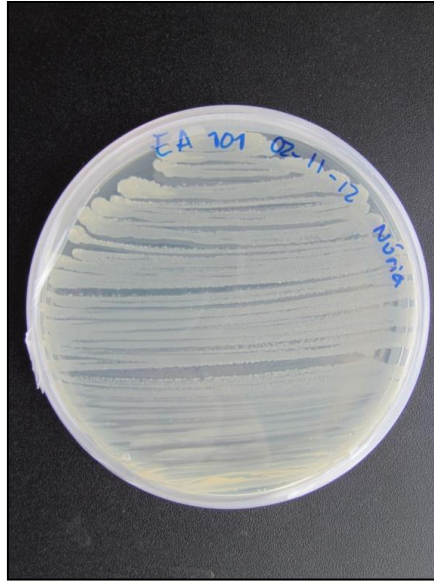


Figura 2.2 Placa de medi LB amb la soca virulenta EPS101 d'*E. amylovora* sembrada

Per a la realització dels bioassajos es va utilitzar una suspensió d'una concentració de 10^7 ufc/ml del patogen. Per a preparar aquesta suspensió, es van agafar amb una nansa de Kolle colònies de cultius de 24h procedents de la superfície de les plaques on havia crescut el bacteri; a continuació, el material bacterià es va suspendre en aigua destil·lada estèril dins d'un tub de dilució. Un cop homogeneïtzada la suspensió utilitzant un vòrtex, es va ajustar la concentració mitjançant la determinació de la seva absorbància per espectrofotometria (Espectrofotòmetre Shimadzu UV-VIS, Grams Instrumented, EUA) amb la referència que un valor d'absorbància de 0.12 a una longitud d'ona de 600 nm equival a una concentració de 10^8 ufc/ml d'*E. amylovora* EPS101. Tot seguit, es van realitzar dilucions decimals per tal d'obtenir la concentració desitjada.

Ja que el patogen és considerat de quarantena a Espanya, totes aquestes operacions es van realitzar amb seguretat dins d'una campana de flux laminar de classe II (Nuair class II UN-426-400E, Nuair Inc, EUA).

2.5 BIOASSAJOS PER SELECCIONAR SOQUES BAL EFICACES EN EL CONTROL D'*E. amylovora*

Per tal de determinar l'efecte dels aïllats de BAL davant l'*E. amylovora*, els bioassajos realitzats es van dur a terme en condicions ambientals controlades.

2.5.1 Assaig d'eficàcia en fulles

Es va realitzar un bioassaig *ex vivo* en fulles optimitzat anteriorment (Daranas, 2011). Els resultats obtinguts van complementar els d'anteriors assajos d'eficàcia en flors i fruits i van servir per seleccionar les soques més eficaces que es van utilitzar en els assajos posteriors, descrits en aquesta memòria, d'eficàcia i supervivència.

L'assaig va consistir en determinar l'eficàcia dels BAL en la inhibició de les infeccions d'*E. amylovora* en fulles de perer.

Per a la realització de l'assaig, es van utilitzar 106 tractaments; van consistir en 100 tractaments amb diferents soques de BAL a una concentració de 10^8 ufc/ml (Taula 2.1) i 6 tractaments amb agents de biocontrol o productes de referència utilitzats com a controls (Taula 2.2). Es van utilitzar *P. fluorescens* EPS62e a una concentració de 10^8 ufc/ml, *P. vagans* C9-1 a una concentració de 10^8 ufc/ml, *B. subtilis* AMP20017 10^8 ufc/ml, el producte comercial Serenade® (4 g/l) compostat per *B. subtilis* QST713, l'antibiòtic estreptomicina (100 mg/l) i un control no tractat amb únicament aigua.

Per a cada tractament es van realitzar tres repeticions de tres fulles cada repetició.

Abans del tractament les fulles es van netejar amb aigua per tal d'eliminar possibles residus de productes fitosanitaris emprats, terra i insectes; a continuació, es van desinfectar per immersió en una solució de lleixiu al 5% durant un min i es van esbandir dues vegades amb aigua destil·lada (figura 2.3).



Figura 2.3 Procediment de neteja de les fulles. Cubells amb aigua, solució de lleixiu al 5% i aigua destil·lada.

Per tal de proporcionar una via d'entrada al patogen, es va fer una ferida al nervi de la fulla a una distància d'un terç respecte la part basal (figura 2.4). Per a fer els talls, es van utilitzar un bisturí estèril i guants.



Figura 2.4 Realització de les ferides a les fulles: al nervi de la fulla i a un terç de la dimensió de la fulla respecte a la part basal.

Un cop fetes les ferides, les fulles es van tractar per immersió amb les soques de BAL i amb els agents de biocontrol de referència. En el tractament per immersió, es van submergir les fulles dins les suspensions amb l'ajuda d'unes pinces desinfectades (figura 2.5); un cop impregnades del líquid, es van col·locar dins caixes de plàstic de 42 x 30 x 7 cm sobre unes reixetes de plàstic, tot prèviament desinfectat. Sota de les reixetes, es van col·locar quatre capes de paper de filtre estèril humitejat amb aigua també estèril. La funció del paper humit va ser mantenir una humitat elevada dins la caixa per tal de crear unes condicions òptimes per al creixement de bacteris. L'objectiu de les reixetes, va ser evitar el contacte directe de les fulles amb al paper humit.



Figura 2.5 Tractaments de les fulles amb BALs per immersió utilitzant unes pinces prèviament desinfectades.

Finalment, es van introduir les caixes dins de bosses de plàstic segellant-les amb cinta i es van deixar al laboratori de seguretat a una temperatura ambient d'aproximadament 25°C (figura 2.6).



Figura 2.6 Caixes utilitzades per col·locar les fulles tractades amb BALs

Després de 24h des de la realització dels tractaments, es van inocular les ferides de les fulles amb 10 µl de suspensió d'*E. amylovora* a una concentració de 10⁷ ufc/ml.

La inoculació d'*E. amylovora* es va dur a terme dins el laboratori de seguretat i amb totes les precaucions esmentades amb anterioritat.

Amb la finalitat de poder quantificar el nivell d'infecció present a cada fulla, es va establir un índex de severitat graduada del 0 al 3, de menor a major infecció respectivament. A la següent

figura 2.7, es mostra l'escala d'infecció segons els símptomes d'infecció d'*E. amylovora* en les fulles.

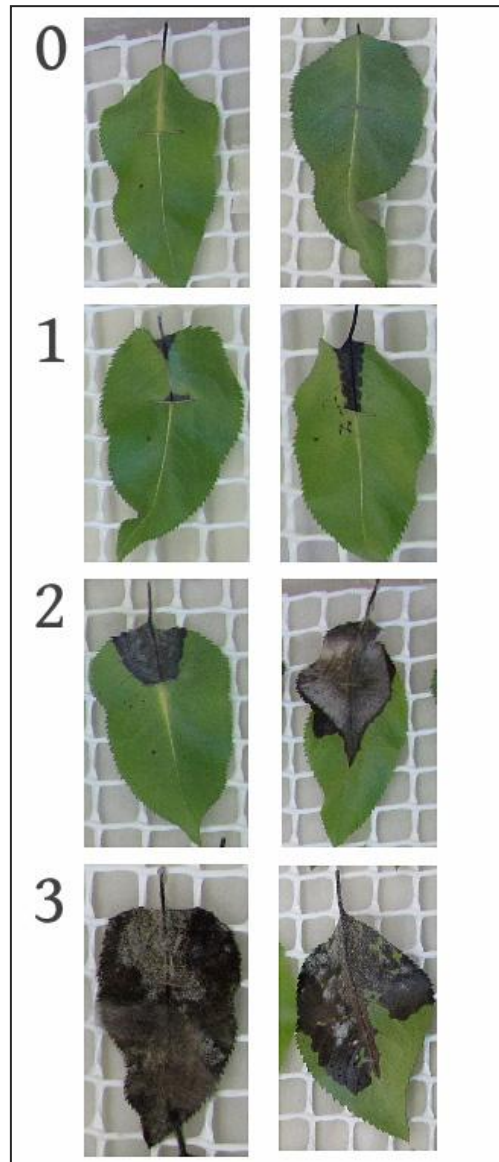


Figura 2.7. Índexs de severitat de la infecció d'*E. amylovora* en les fulles. (0, absència de símptomes; 1, necrosi al nervi de la fulla, al voltant de la ferida; 2, necrosi al nervi i als extrems de la fulla; 3, progressió de la necrosi a tota la superfície de la fulla).

Es van realitzar lectures de l'índex de severitat de les fulles a partir aquestes van mostrar indicis d'infecció, al cap de 5-7 dies de la inoculació del patògen, fins que aquestes van assolir un grau d'infecció majoritari de 3. Es va considerar el dia 13 posterior a la inoculació del patògen com a lectura més representativa de la infecció causada.

Es va calcular el percentatge de severitat a partir de la següent fórmula:

$$S = \sum_{i=1}^n \left(\frac{SI_i}{n \cdot 3} \right) \cdot 100$$

S correspon al percentatge de severitat causada per la infecció d'*E. amylovora*; SI és l'índex de severitat; i és el número de fulla; n correspon al número de fulles per tractament; 3 és el nivell màxim d'infecció.

Es va obtenir percentatge d'incidència utilitzant la següent fórmula:

$$I = \frac{Fi}{Ft} \cdot 100$$

I correspon al percentatge d'incidència de fulles infectades; Fi és el nombre de fulles infectades en valor absolut; Ft correspon al nombre total de fulles inoculades.

2.5.2 Assaig d'eficàcia en flors

L'objectiu de l'assaig va consistir en determinar l'eficàcia de 8 soques BAL seleccionades a partir dels resultats dels assajos anteriors en la inhibició de les infeccions per *E. amylovora* en flors.

Es van realitzar 8 tractaments amb les soques de BAL: TC92, TC54, PM411, PC40, FC560, AC73, CM209 i PM366; 1 control no tractat amb aigua; 3 tractaments amb agents de biocontrol de referència: *P. fluorescens* EPS62e i *P. vagans* C9-1 i el producte Serenade® compostat per *B. subtilis* QST713; i un tractament amb estreptomicina (100mg/l).

Es van realitzar dos experiments, amb flors de perera de la varietat Passe Crassane i amb flors de pomera de la varietat Golden Delicious. Cada experiment, es va realitzar per duplicat. En cada tractament es van realitzar tres repeticions de tres flors cada repetició.

Les flors es van conservar en refrigeració i, un cop al laboratori, se'ls van arrencar els pètals de i es van col·locar individualment dins de tubs eppendorf amb el peduncle tallat i submergit en una solució de sacarosa al 10% (p/v).

Les flors es van tractar per pulverització, amb les suspensions de BAL i dels agents de biocontrol preparades anteriorment a 10^8 ufc/ml en aigua destil·lada estèril, de manera que la flor quedés impregnada totalment per la suspensió.

Un cop inoculades, les flors es van introduir dins de caixes de plàstic de 42 x 30 x 7 cm prèviament humitejades que es van segellar dins bosses de plàstic. Les caixes amb les flors es van incubar a 25°C.

Després de 24 h de la realització dels tractaments dels agents de biocontrol (ABC), les flors es van inocular amb 10 µl de suspensió d'*E. amylovora* a una concentració de 10⁷ ufc/ml (imatge 2.8). El patogen es va dipositar amb una pipeta en el receptacle de les flors.



Figura 2.8 Inoculació de la suspensió d'*E. amylovora* a una concentració de 10⁷ ufc/ml.

Una vegada inoculat el patogen, les caixes es van tornar a segellar amb bosses de plàstic i es van deixar incubant a 25°C dins el laboratori de seguretat.

La determinació de la incidència i severitat produïdes per la infecció d'*E. amylovora*, es van realitzar als 1, 2, 3 i 5 dies de la inoculació del patogen.

Es va establir una escala per determinar l'índex de severitat del 0 al 3, de menys a més infecció respectivament.

2.5.3 Assaig d'eficàcia en planta perera en contenidor

L'objectiu de l'assaig, va consistir en determinar l'eficàcia *in vivo* de les soques de BAL en el control d'*E. amylovora* en plantes de perera

L'assaig es va realitzar per duplicat. Per a la realització d'aquest, es van utilitzar 96 plantes de perer de la varietat Conference (8 tractaments x 3 repeticions x 2 plantes cada repetició x 2, assaig duplicat).

La inoculació del patogen es va fer a tres brots de la planta; per tal d'evitar confusions, es van seleccionar plantes amb únicament tres brots.

Es van utilitzar tres soques de BAL: TC92, PM411 i TC54; i cinc controls: el producte comercial Serenade®, l'antibiòtic estreptomicina (100 mg/l), els agents de biocontrol EPS62e i C9-1 i un control d'aigua sense tractament.

Es van fer dues ferides per fulla, a les tres primeres fulles dels tres brots de la planta. Les ferides es van fer en el centre del nervi central de la fulla, deixant una separació respecte els dos talls de mig centímetre. A continuació, es van tractar les plantes per pulverització amb 10 ml per planta de les suspensions de BAL (10^8 ufc/ml) i amb els altres agents de biocontrol (figura 2.9). Per a la inoculació, es va utilitzar una aerògraf (Fifty, Hercules Industries, Estats Units).



Figura 2.9 Tractaments de BALs de les plantes de perera per pulverització.

Finalment, es van col·locar les plantes de dos en dos dins una bossa de plàstic segellada i es van portar al laboratori de seguretat a 25°C i amb humitat relativa elevada.

24 h després dels tractaments amb BAL es van inocular les plantes amb 10 µl d'una suspensió d'*E. amylovora* a 10^6 ufc/ml, dipositada al mig de les dues ferides fetes a les fulles.

Finalment, es van segellar les plantes dins una bossa de plàstic i es van col·locar al laboratori de seguretat amb 16 h de llum fluorescent i un període de 8 h de foscor.

La inoculació d'*E. amylovora* es va dur a terme dins el laboratori de seguretat i amb totes les precaucions esmentades amb anterioritat.

La intensitat d'infecció es va determinar amb la mateixa escala del 0 al 3 utilitzada en l'assaig d'eficàcia en fulles (figura 2.7) (0, absència de símptomes; 1, necrosi al nervi de la fulla, al voltant de la ferida; 2, necrosi al nervi i als extrems de la fulla; 3, progressió de la necrosi a tota la superfície de la fulla).

Les lectures escollides per al tractament de les dades a l'assaig, corresponen als 8 dies posteriors a la inoculació de *E. amylovora*. El tractament de les dades, es va realitzar estadísticament per anàlisi de variància de la incidència i severitat de la intensitat de la infecció en cada tractament.

2.6 SUPERVIVÈNCIA DE BAL EN FLORS de pomera i perera

L'objectiu de l'assaig va consistir en determinar la capacitat de tres soques de BAL, TC54, TC92 i PM411, de colonitzar i sobreviure sobre material vegetal en diferents condicions d'humitat.

Es van realitzar dos experiments, un experiment amb flors de pomera i un experiment amb flors de perera.

Es van recollir flors de perera de la varietat Passe Crassane i de pomera de la varietat Golden Delicious d'una finca comercial del terme municipal de Campllong i es van conservar en refrigeració fins a l'arribada al laboratori. Un cop al laboratori, es van col·locar individualment dins de tubs amb el peduncle tallat i submergit en una solució de sacarosa al 10% (p/v).

Per a la realització de l'assaig es van seleccionar tres soques de BAL: PM411, TC54 i TC92; es van utilitzar mutants espontanis resistents a l'àcid nalidíxic (PM411N) i rifampicina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) (TC54R i TC92R). Aquestes soques resistents als antibiòtics no presenten cap diferència de creixement respecte a les soques convencionals.

Les flors es van inocular per pulverització amb 2-5 ml de suspensió de la corresponent soca de BAL, ajustada anteriorment a una concentració de 10^8 ufc/ml.

Es van dipositar les flors de tots dos experiments, flors de perera i flors de pomera, a 25°C en diferents condicions d'humitat: humitat alta (90%) i humitat baixa (50%).

Es van realitzar dos experiments (un en flors de pomera i l'altre en flors de perera) amb tres tractaments de BAL cada un i amb 3 repeticions de 30 flors per a cada tractament.

Per a determinar els nivells de població de les soques de BALs, es van agafar cinc flors a les 0, 24, 48, 120, 168 i 216h posteriors a la inoculació dels BAL. Aquestes mostres es van homogeneitzar en 20 mL de tampó fosfat (pH 7.0) 0.05M i 0.1% de peptona mitjançant un stomacher (Masticator; IUL Instruments, United Kingdom). Amb la suspensió resultant es va realitzar un banc de dilucions i es va sembrar mitjantant un sistema d'espiral (Eddy Jet; IUL Instruments, Spain) en plaques de medi agar MRS amb 50 µg/ml de rifampicina o àcid nalidíxic per a seleccionar la soca sembrada; es van afegir 10 µg/ml de nitrat d'econazol (SIGMA, Missouri, USA) amb la finalitat de prevenir un creixement fúngic.

Es van incubar les plaques a 25°C durant 48h. Les colònies es van contar amb un sistema de recompte automàtic (Counterstat Flash; IUL Instruments, Spain) per tal de determinar el nivell poblacional al llarg del temps en forma de \log_{10} UFC /flor.

3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

L'actual utilització de productes químics i mètodes en general poc eficaços pel control del foc bacterià i la sensibilització per la cura del medi ambient, juntament amb la importància de la malaltia i la seva repercussió econòmica, desemboquen en la necessitat de buscar alternatives de control.

Varis informes demostren les propietats bioprotectors dels BAL contra els bacteris patògens transmesos pels aliments, incloses fruites i verdures fresques (Holzapfel *et al.*, 1995; Trias *et al.*; 2008a, 2008b) així com contra la pudrició postcollita de fruites (Trias *et al.*, 2008c). Rarament s'han estudiat els bacteris de l'àcid làctic com a agents de biocontrol potencials dels bacteris patògens de plantes (Visser *et al.*, 1986). Una possible raó és que els BAL tenen un creixement més lent i queden encoberts per altres habitants comuns com l'espècie *Pantoea* i *Pseudomonas* en els medis de cultiu utilitzats per al seu aïllament (TSA, KB o LB).

En investigacions prèvies del grup de patologia vegetal (INTEA), es va aïllar una col·lecció de 600 soques de bacteris de l'àcid làctic procedents d'ambients naturals i de fruites i hortalisses mínimament processades, es va determinar la presència de gens que codifiquen per alguna de les bacteriocines plantericina, nisina i mesentericina i es va avaluar l'antagonisme *in vitro* davant *E. amylovora* i altres bacteris fitopatògens indicadors (Suriñach, 2011); a partir dels resultats, es van seleccionar 100 soques de BAL.

En el present treball, integrat en la línia d'investigació del grup de recerca de patologia vegetal (INTEA), s'ha experimentat amb bacteris de l'àcid làctic com a agents de biocontrol del foc bacterià amb l'objectiu de seleccionar-ne les soques òptimes. En el present estudi, s'han obtingut possibles soques de BAL capaces d'actuar com a agents de control del foc bacterià en plantes de la família de les rosàcies.

Per tal de determinar l'activitat antimicrobiana, és necessari disposar de bioassajos que permetin avaluar simultàniament un nombre elevat de soques; en estudis previs es van optimitzar assajos *ex vivo* en flors i fruits immadurs de perer (Cabrefiga, 2004) i en fulles de perer (Daranas, 2011). En el procés experimental d'aquest treball, s'utilitzen aquests mètodes optimitzats per a la realització dels assajos *ex vivo*.

Les diferents variables a considerar que dificulten l'anàlisi de resultats, va fer notòria la necessitat de realitzar repeticions dels bioassajos i d'enllaçar els resultats obtinguts amb estudis anteriors. Aquestes variables corresponen a l'estat del material vegetal: les fulles més

tendres van presentar més sensibilitat a la infecció per *E. amylovora* que les fulles adultes ja l'estat de desenvolupament de les fulles condiona significativament la infecció per *E. amylovora* possiblement per què en teixits més joves els sistemes de defensa no estan tan desenvolupats (Daranas, 2011); la severitat i la incidència del foc bacterià depèn de l'estat de maduració dels teixits de la planta i s'obtenen elevats nivells de la infecció en teixits joves (Cabrefiga, 2004).

En el bioassaig per determinar l'eficàcia dels BAL en la infecció per *E. amylovora* en fulles de perer de la varietat Passe Crassane, es van utilitzar suspensions de 100 soques de BAL (taula 2.1) a una concentració de 10^8 ufc/ml, 4 agents de biocontrol de referència, un tractament amb estreptomicina (100 mg/l) i un control no tractat d'H₂O. Es va inocular la soca EPS101 d'*E. amylovora* a una concentració de 10^7 ufc/ml.

Posterior a la inoculació del patogen, es van realitzar lectures periòdicament durant 25 dies. La lectura mostrada en aquesta memòria per al tractament de les dades a l'assaig, correspon als 13 dies de la inoculació del patogen.

Es va determinar la severitat i la incidència de la infecció amb l'objectiu d'avaluar la capacitat de control de la infecció de les soques de BAL.

Els resultats obtinguts en aquest bioassaig, van lligats a resultats obtinguts en estudis anteriors amb la finalitat de seleccionar les soques de bacteris de l'àcid làctic de major eficàcia en la prevenció de la infecció per *E. amylovora*. En la taula 3.1 es pot observar la severitat de la infecció en els diferents tractaments. La severitat del primer assaig correspon a estudis anteriors (Daranas, 2011) i la del segon assaig la determinada en aquest treball de fi de carrera. En els dos assajos es va observar un efecte molt significatiu de les soques bacterianes en la severitat de la infecció ($P < 0.0001$). Es va realitzar un ANOVA i la separació de mitjanes mitjançant el test de tukey la mínima diferència significativa; en el primer assaig va ser de 17,1% en el primer assaig i de 19,2% en el segon. En el primer assaig els percentatges de severitat de la infecció per *E. amylovora* que es van obtenir oscil·len entre 18,52 i 88,9%; en el segon assaig van prendre valors d'entre 1 i 90%. Les soques de BAL que van presentar severitats de la infecció significativament diferents a les del control no tractat es mostren en negreta pel primer assaig i subratllat pel segon. En el primera assaig el tractament amb estreptomicina no va resultar ser significativament diferent del control no tractat, en el segon assaig sí que ho va ser. En els dos assajos els agents de bicontrol emprats (EPS62e, AMP20017, C9-1 i Serenade®) van presentar percentatges de severitat significativament diferents respecte al control no tractat. En el primer assaig les soques que van reduir la severitat de la infecció a

percentatges inferiors al 30% van ser: FC560, EC586, RC526, 562 i 202, juntament amb l'agent de biocontrol AMP20017; en el segon assaig van ser: PC263, AC367, AM266, PM285, TM106, BC37, BC188, EM214, TC46, RC524, CC598, FC212, PM411, TC92, CC597, BC176, CC575, CC596, PC202, BC24, CC31, CM205, PC29, CM466, EC562, CM209, NC568, TC54, EC586, RC526, CC121 i BC66, juntament amb les soques de biocontrol EPS62e, C9-1 i Serenade®. A la figura 3.1 es poden observar els símptomes de la infecció provocada per *E. amylovora* en fulles que es van tractar amb estreptomocina, les soques EPS62e, PM340, CM356, PM357 i el control no tractat.

Taula 3.1 Efecte del tractament amb 100 soques de BAL, 4 agents de biocontrol, un tractament amb estreptomocina i un control no tractat (H₂O) en la severitat de la infecció causada per *E. amylovora* als 13 dies de la inoculació de les fulles de perer de la varietat Passe Crassane.

Tractament ¹	Severitat de la infecció (%) ²	
	1er assaig	2 on assaig
PC64	88.89	90.00
H ₂ O	81.48	90.00
CC70	81.48	82.00
AC569	70.37	80.10
TC69	81.48	80.00
PC216	74.07	80.00
BM259	81.48	79.50
AC81	77.78	79.00
TC71	77.78	78.30
TC97	68.30	77.20
PM340	58.00	76.20
NC591	76.00	75.30
AC84	74.07	75.20
CM338	77.78	75.00
TC44	74.07	74.07
PM407	62.96	73.50
CC555	85.00	73.20
AC47	70.30	73.10
CM135	62.96	72.00
TC35	69.80	71.40
PM490	81.65	70.50
EM16	79.50	70.50
PC49	75.20	70.40
PC99	70.37	70.30
TM358	66.67	70.10
AC318	70.37	70.00
PC583	59.00	68.90
TC41	66.67	68.20

(continua)

Tractament ¹	Severitat de la infecció (%) ²	
	1er assaig	2 on assaig
<u>CC93</u>	74.07	68.00
<u>OC590</u>	66.67	68.00
<u>AC316</u>	66.67	66.30
<u>PM314</u>	66.67	65.70
<u>FC248</u>	62.96	64.70
<u>TC110</u>	62.96	63.80
<u>CC80</u>	59.26	62.10
<u>PC25</u>	62.96	61.40
<u>SM303</u>	62.96	61.30
<u>TC60</u>	55.56	60.20
<u>TC102</u>	62.96	60.10
<u>PC67</u>	59.26	58.40
<u>CC592</u>	66.67	55.20
<u>PM357</u>	59.26	52.10
<u>CM144</u>	51.85	51.00
<u>PC579</u>	51.85	49.30
<u>PC254</u>	59.26	48.50
<u>FC306</u>	59.26	47.30
<u>OC503</u>	48.15	47.30
<u>CC32</u>	40.74	47.20
<u>FC534</u>	51.85	46.20
<u>CM359</u>	59.26	43.30
<u>TC101</u>	62.96	43.20
<u>BC184</u>	51.85	43.20
<u>AC73</u>	50.00	42.30
<u>MC5</u>	44.44	42.30
AMP20017	25.93	42.30
<u>CM165</u>	40.74	41.30
<u>PM40</u>	59.26	38.00
<u>GC521</u>	37.04	36.10
<u>FC533</u>	37.04	35.90
<u>PM366</u>	44.44	35.60
<u>FC560</u>	29.63	35.60
<u>PC52</u>	59.26	35.40
<u>CM160</u>	44.44	35.40
<u>TC28</u>	62.96	34.00
<u>BC30</u>	51.85	34.00
<u>AC59</u>	51.85	33.80
<u>BC50</u>	44.44	33.80
<u>CM356</u>	44.44	32.60
<u>CC100</u>	44.44	31.60
<u>AC58</u>	40.74	30.20
<u>PC263</u>	44.44	29.40

(continua)

Tractament ¹	Severitat de la infecció (%) ²	
	1er assaig	2 on assaig
<u>AC367</u>	40.74	28.90
<u>AM266</u>	44.44	28.60
C9-1	37.04	28.40
<u>PM285</u>	40.74	27.90
<u>TM106</u>	55.56	27.60
<u>BC37</u>	62.96	27.50
<u>BC188</u>	51.85	26.70
<u>EM214</u>	40.74	26.40
<u>TC46</u>	51.85	25.90
<u>RC524</u>	48.15	25.60
<u>CC598</u>	40.74	25.60
<u>FC212</u>	37.04	24.70
<u>PM411</u>	59.26	24.35
<u>TC92</u>	44.50	24.00
<u>CC597</u>	44.44	23.50
<u>BC176</u>	37.04	23.50
<u>CC575</u>	33.33	22.80
<u>CC596</u>	59.26	22.30
<u>PC202</u>	18.52	21.90
estreptomicina	74.07	21.00
<u>BC24</u>	48.15	19.50
<u>CC31</u>	40.74	19.20
<u>CM205</u>	51.85	18.90
<u>PC29</u>	48.15	17.60
<u>CM466</u>	59.26	17.50
<u>EC562</u>	22.22	16.80
<u>CM209</u>	33.33	15.40
EPS62e	44.44	15.30
<u>NC568</u>	51.85	12.80
<u>TC54</u>	40.74	12.30
<u>EC586</u>	29.63	12.30
<u>RC526</u>	25.93	12.30
<u>CC121</u>	48.15	12.00
<u>BC66</u>	48.15	5.00
Serenade	55.56	1.00
Mínima diferència significativa	17.11	19.2

Els valors de severitat estan ordenats segons la separació de mitjanes realitzada en el bioassaig d'eficàcia en fulles.

¹ Les fulles es van tractar per immersió en suspensions de 10^8 ufc/ml de 90 soques de BAL, 4 agents de biocontrol i un tractament amb estreptomicina (100 mg/l) i es van inocular amb 10 µl d'una suspensió d'*E. amylovora* EPS101 a 10^7 ufc/ml sobre la ferida.

² Els valors de severitat corresponen a la mitjana de tres repeticions i tres fulles per repetició, als 13 dies de la inoculació del patogen.



Figura 3.1 Síntomes de la infecció provocats per *E. amylovora* en fulles que es van tractar amb estreptomicina, les soques EPS62e, PM340, CM356, PM357 i el control no tractat respectivament.

Els percentatges d'eficàcia varien en funció dels òrgans utilitzats per a la realització de l'assaig (fulles, flors i fruits); és per això que per avaluar l'eficàcia de les 100 soques de BAL de forma genèrica per a tots els òrgans, es van relacionar els resultats de l'assaig d'eficàcia en fulles amb altres assajos *ex vivo* en flors i fruits realitzats fins al moment pel centre de recerca CIDSAV de la Universitat de Girona.

Diverses de les soques van mostrar una reducció significativa ($P < 0.05$) de les infeccions causades per *E. amylovora* en comparació al control sense tractar. A la figura 3.2a es pot observar el percentatge de la incidència de les infeccions en fulles, fruits immadurs i flors de perer Passe Crassane tractades amb soques de *L. plantarum*, juntament amb la incidència en el control no tractat. La majoria de les soques, només van reduir les infeccions en un sol òrgan (figura 3.2b); 7 soques van resultar eficients en el control en fruits immadurs (TC41, BC24, CM359, TC97, PC29, AC81 i TC60); 6 soques van ser efectives en flors (PM35, AM266, TM358, CM205, PC579 i AC316); i 11 soques van reduir la infecció en fulles (CC31, CM165, RC526, BC50, EM214, CM466, FC212, PC263, EC586, PM357 i CC575). Les soques eficaces per a flors i fulles van ser la PM366, la FC560 i la PM411; en fulles i fruits immadurs la CM209 i la AC73; i en fruits immadurs i flors la TC40. Les soques TC54 i TC92 van resultar les soques més eficients en el control de l'infecció en tots els òrgans.

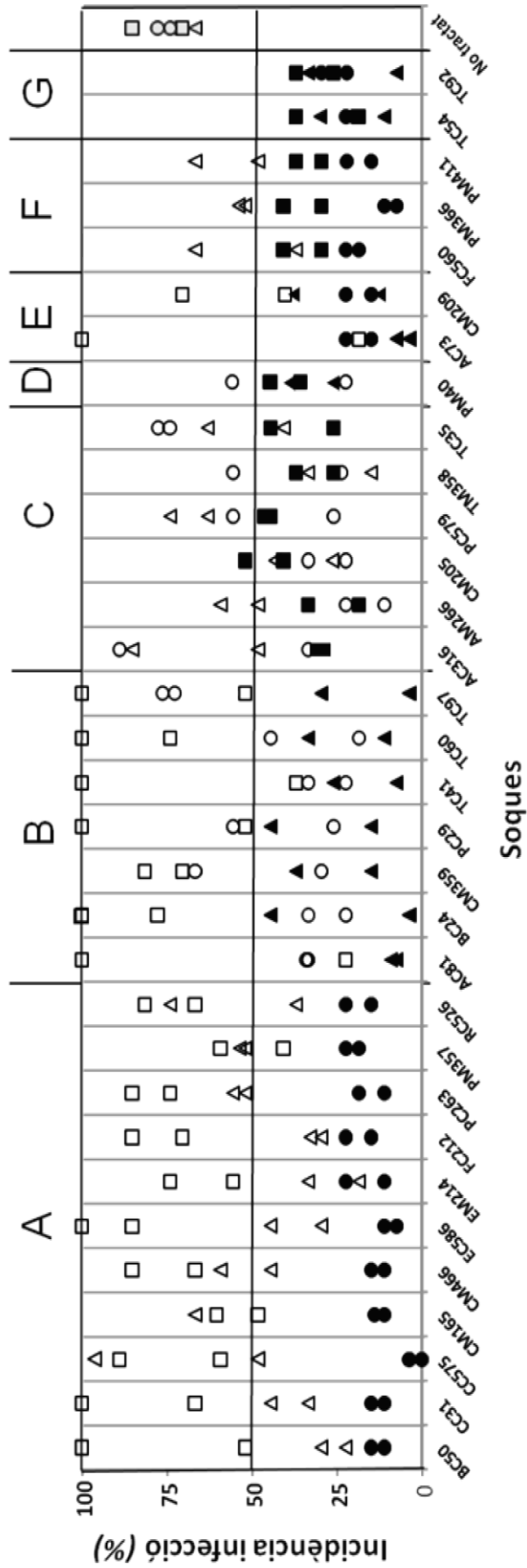


Figura 3. 2a Incidència de les infeccions per foc bacterià en fulles (□), fruits immadurs (Δ) i flors (○) de perer Passe Crassane preventivament tractades amb soques de *L. plantarum*, amb comparació amb el control no tractat. Les soques amb símbols negres van mostrar nivells d'infecció significativament diferents ($P < 0,01$) als controls no tractats en els dos experiments portats a terme en cada òrgan de la planta. Les soques estan agrupades en relació a la seva capacitat de protecció de les infeccions en fulles (A), fruits immadurs (B), flors (C), fruits immadurs i flors (D), fulles i fruits immadurs (E), fulles i flors (F) i als tres òrgans simultàniament (G).

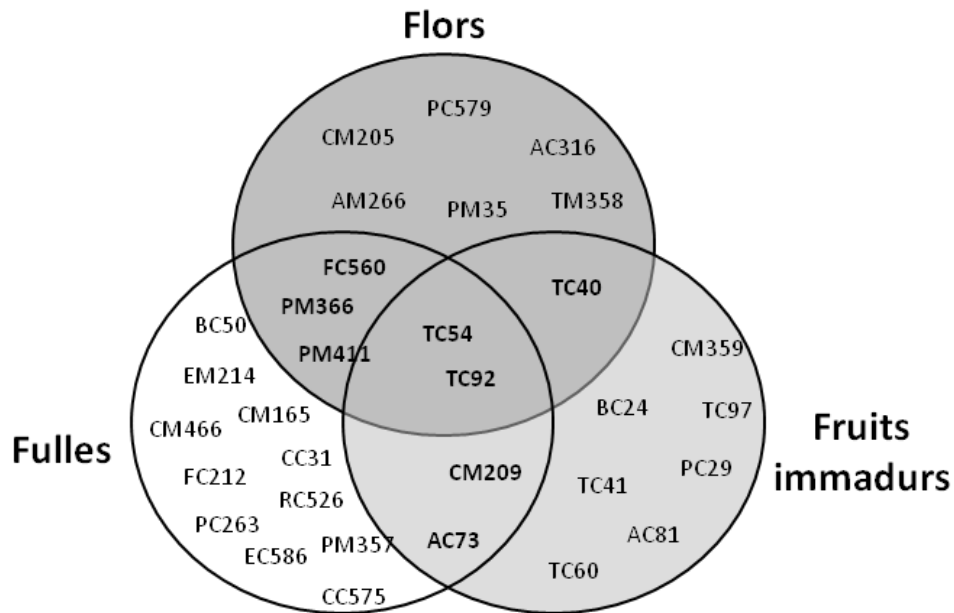


Figura 3.2b Soques de BAL amb les que s'obté una reducció significativa ($P < 0.05$) de les infeccions per *E. amylovora* respecte el control no tractat en assajos *ex vivo* realitzats en flors, fulles i fruits immadurs, simultàniament en dos experiments realitzats. Les soques remarcades amb negreta són les que es van seleccionar per posteriors experiments.

Es va realitzar un bioassaig d'eficàcia en flors de perera de la varietat Passe Crassane i pomera de la varietat Golden Delicious tractant amb les 8 soques de BAL amb eficàcia en més d'un òrgan (PM366, FC560, PM411, CM209, AC73, TC40, TC54 i TC92). Es va utilitzar una concentració de 10^8 ufc/ml, EPS62e, C9-1, Serenade® i estreptomicina, juntament amb un control sense tractar. Es van inocular amb el patogen a una concentració de 10^7 ufc/ml.

Es va realitzar la lectura dels resultats als 13 dies des de la inoculació del patogen.

A la figura 3.3 es representen els percentatges de severitat en la infecció dels dos experiments que es van realitzar per duplicat. Els percentatges de severitat en l'experiment amb flors de pomera oscil·len entre 20 i 50%, en l'experiment en flors de perer oscil·len entre 10 i 40%. Totes les soques de BAL van presentar severitats significativament diferents a les severitats presentades en les flors amb el control no tractat. Els nivells d'eficàcia no van diferenciar-se significativament dels obtinguts pels altres agents de biocontrol: *P. fluorescens* EPS62e, *P. vagans* C9-1, el producte Serenade® compostat per *B. subtilis* QST713 i el tractament amb estreptomicina (100mg/l). Les soques amb menor severitat en la infecció en els dos experiments van ser la TC92, la TC54, la PM411 i la PC40. ®. A la figura 3.4 es poden observar els símptomes de la infecció provocada per *E. amylovora* en flors no tractades.

Assajos realitzats per Pussey (1997) indiquen que els resultats en flors, obtinguts al laboratori, de l'avaluació dels microorganismes com a agents de biocontrol, es poden utilitzar per pronosticar l'acció d'aquests com a control d'infecció d'*E. amylovora* a camp.

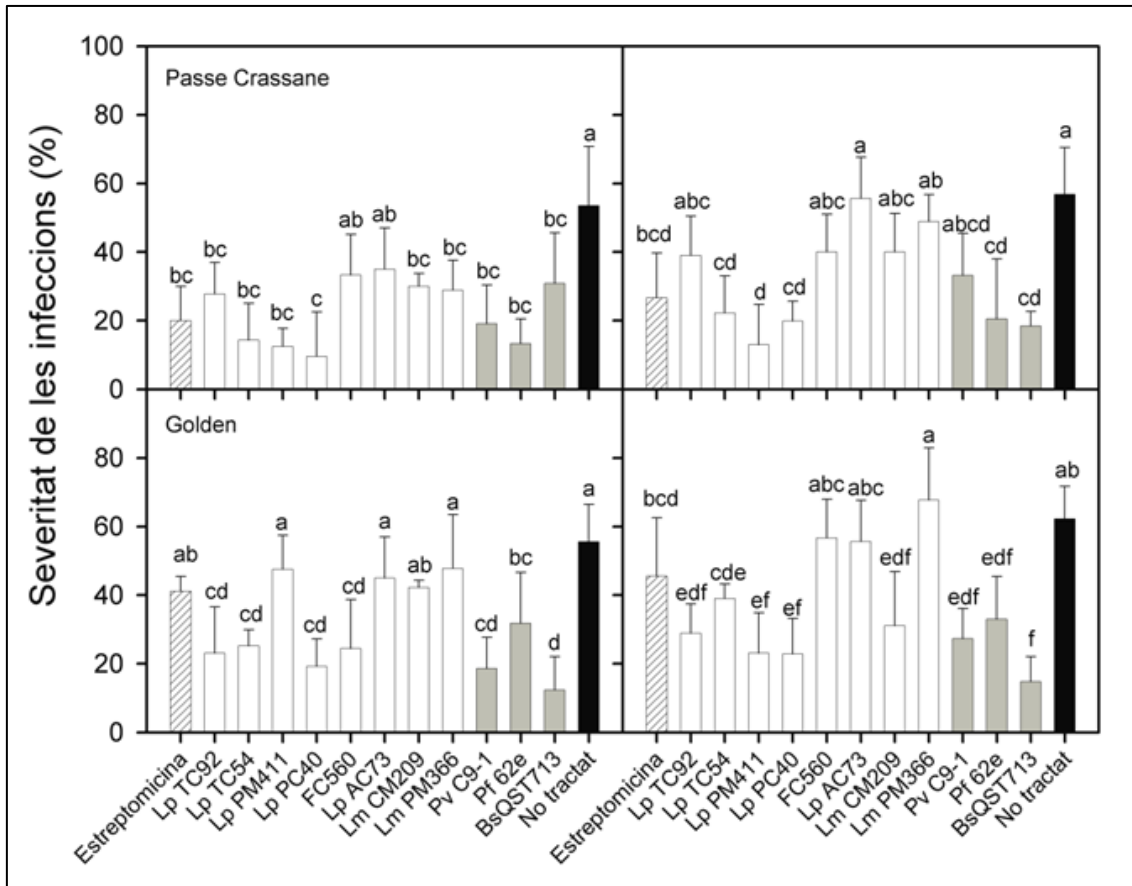


Figura 3.3 Efecte dels tractaments amb soques de *L. plantarum* (barres blanques) en les infeccions d'*E. amylovora* en flors de perera Passe Crassane i de pomera Golden. Els tractaments amb BALs es van comparar amb estreptomicina (barres ratllades), ACB de referència (barres grises) i un control no tractat (barres negres). Les flors es van tractar i posteriorment es van inocular amb *E. amylovora* a 1×10^7 UFC ml⁻¹. Els valors són la mitjana de tres rèpliques. Les barres d'error representen el interval de confiança de la mitjana (95 %). Les barres amb la mateixa lletra de cada figura no difereixen significativament ($P < 0.05$) segons el test de Waller-Duncan.

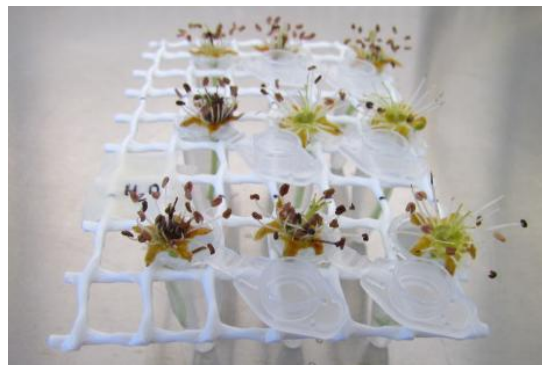


Figura 3.4 Síntomes de la infecció provocats per *E. amylovora* en flors que no tractades

En l'assaig d'eficàcia en planta perera en contenidor es va determinar la severitat dels tractaments *in vivo* utilitzant tres soques de BAL a una concentració de 10^8 ufc/ml: TC92, PM411 i TC54; l'antibiòtic estreptomicina (100 mg/l), els ACB de referència EPS62e, C9-1 i el producte comercial Serenade®; i un control d'aigua sense tractament. Es va utilitzar una concentració del patogen de 10^6 ufc/ml. Es van realitzar dos experiments independents de tres rèpliques cada un.

Les lectures escollides per al tractament de les dades a l'assaig, corresponen als 8 dies posteriors a la inoculació de l'*E. amylovora*.

A la figura 3.3 es representa la mitjana del percentatge de severitat de la infecció de les tres rèpliques per a cada un dels experiments. Totes les soques de BAL van presentar severitats significativament diferents a les presents en les flors del control no tractat menys la soca TC54 en el primer experiment. No existeixen diferències significatives entre les 3 soques de BAL (TC92, TC54 i PM411) i l'estreptomicina. En cap cas les soques de BAL han igualat en eficàcia a la soca de referència C9-1 *P. vagans*. L'ACB de referència amb el valor de severitat més baix va ser el C9-1 seguit per EPS62e. A la figura 3.4 s'observen els símptomes de la infecció provocada per *E. amylovora* en les plantes.

Les soques de *L. plantarum* PM411, TC92 i TC54 són candidates apropiades per a un futur desenvolupament d'agents de biocontrol per la seva gran capacitat de colonització d'hostes, l'absència de preocupacions referents a la seva seguretat alimentària, i els seus bons resultats d'eficàcia en diferents òrgans vegetals. Per contra, la possible utilització d'aquestes soques com a nous bioplaguicides, mereix futurs estudis per confirmar el seu mecanisme d'acció i la importància de les bacteriocines en la seva capacitat de control per tal de poder desenvolupar formulacions eficaces i avaluar la seva eficàcia en proves a camp en diferents condicions agrícoles i climàtiques.

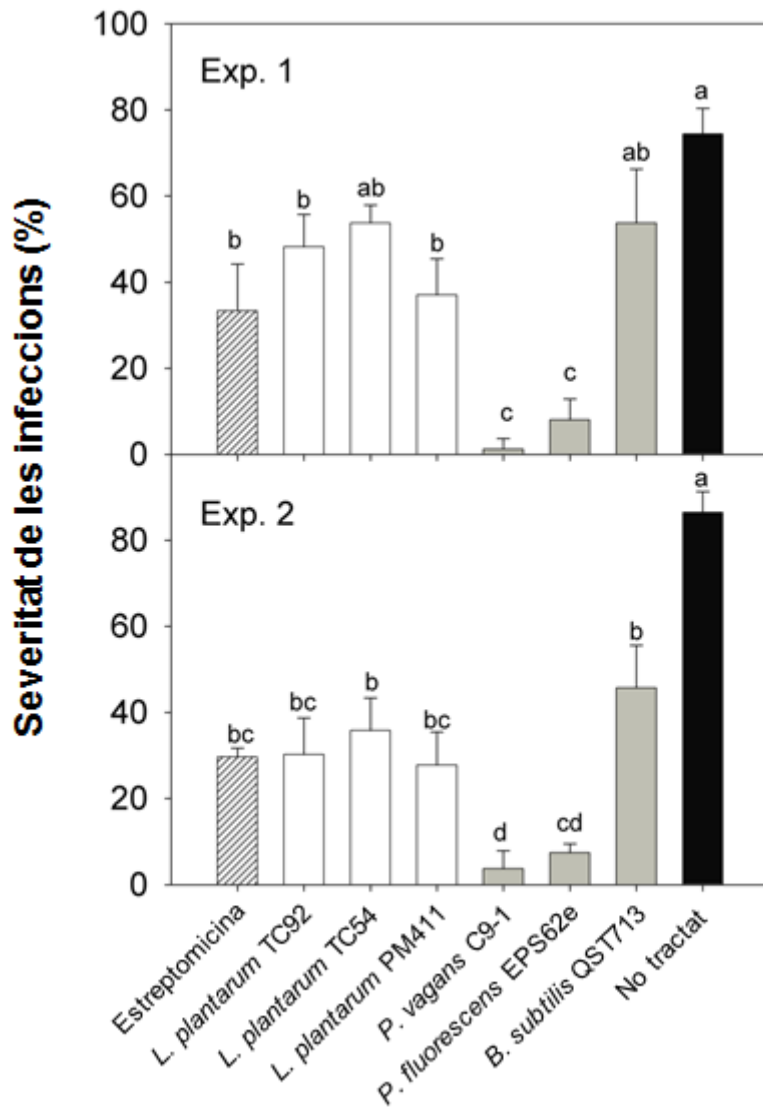


Figura 3.5 Efecte dels tractaments amb soques de *L. plantarum* (barres blanques) en les infeccions d'*E. amylovora* en plantes de perera Conference comparats amb estreptomicina (barres ratllades), ACB de referència (barres grises) i un control no tractat (barres negres). Es van realitzar ferides a les fulles, es van tractar, i les ferides es van inocular amb *E. amylovora* a 1×10^6 UFC ml⁻¹. Les plantes inoculades es van incubar durant 8 dies en condicions ambientals controlades. Es van realitzar dos experiments independents. Els valors són la mitjana de tres rèpliques. Les barres d'error representen el interval de confiança de la mitjana (95 %). Les barres amb la mateixa lletra de cada figura no difereixen significativament ($P < 0.05$) segons el test de Waller-Duncan.



Figura 3.6 Síntomes de la infecció provocada per *E. amylovora* en les plantes.

En els bioassajos de supervivència en flors de perera de la varietat Passe Crassane i pomera de la varietat Golden Delicious i d'eficàcia en planta perera en contenidor de la varietat Conference, es van inocular les soques de BAL amb millors resultats d'eficàcia fins al moment (TC54, TC92 i PM411) amb l'objectiu d'avaluar la seva capacitat de sobreviure i colonitzar material vegetal i la seva eficàcia *in vivo* respectivament.

Es van inocular els BAL a les flors a una concentració de 10^8 ufc/ml i incubar a humitat relativa elevada (90%) i baixa (50%).

Per als dos experiments en flors de pomera i perera, no es van contemplar diferències significatives respecte possibles preferències pel diferent material vegetal (figura 3.5).

Sí que es van notar diferències de comportament de les soques PM411, TC54 i TC92 pel que fa a les condicions d'humitat. En les flors en humitat elevada, al cap de dos dies de la inoculació es detecta un creixement del nivell poblacional equivalent a un logaritme, confirmant la seva habilitat per colonitzar les flors. Durant els 7 dies posteriors a aquest creixement, la població es manté constant. A humitat relativa baixa, la població de cèl·lules sobreviu correctament, al llarg dels 9 dies posteriors a la inoculació, el nivell poblacional descendeix progressivament fins a un logaritme.

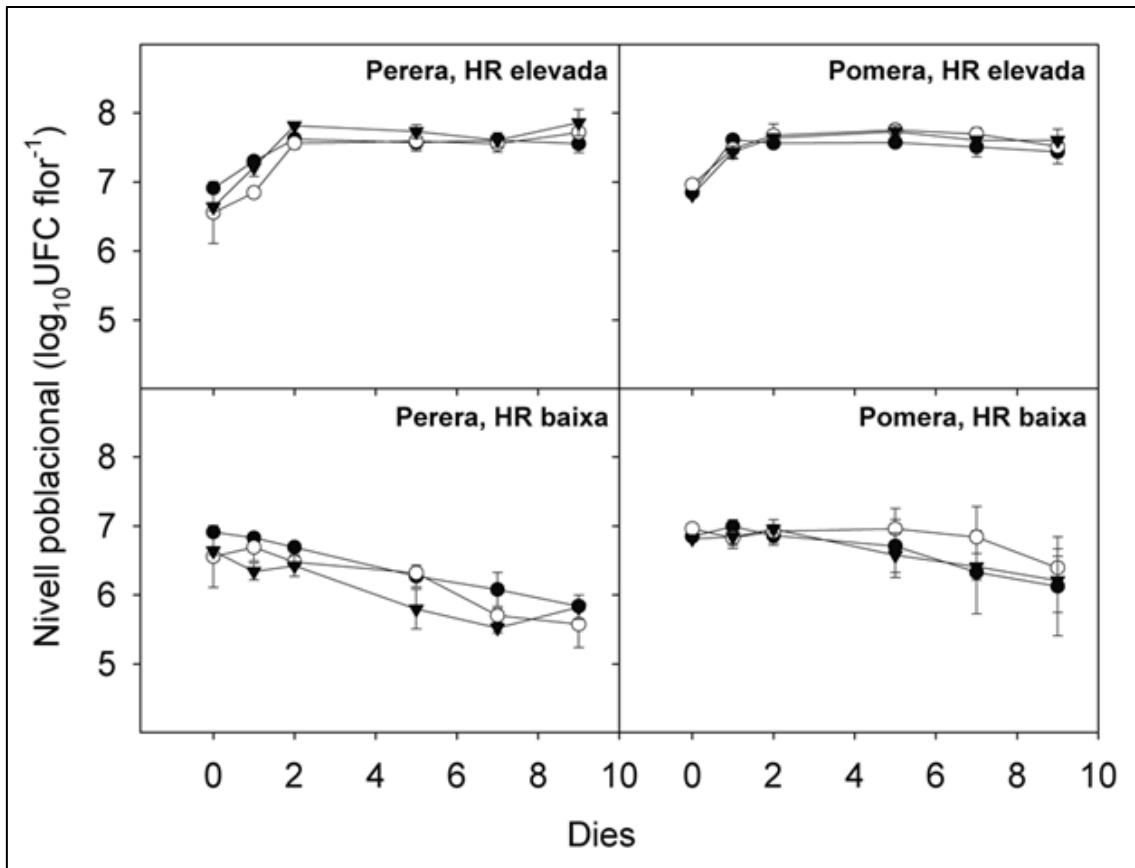


Figura 3.7 Creixement i supervivència de les soques de *L. plantarum* TC54 (●), TC92 (○) i PM411 (▼) en flors de perera 'Passe Crassane' i de pomera 'Golden', a humitat relativa elevada (90%) i baixa (50%). Els valors són les mitjanes de tres rèpliques. Les barres d'error representen els intervals de confiança de les mitjanes (95%).

4 CONCLUSIONS

Les principals conclusions extretes d'aquest treball són les següents:

1. De les 100 soques de BAL avaluades per determinar l'eficàcia de control en fulla, les que obtenen una reducció significativa de les infeccions per *E. amylovora* són: FC560, PM366, PM411, TC54, TC92, CM209, AC73, BC50, EM214, CM165, CM466, FC212, CC31, PC263, EC586, PM357 i CC575.
2. El nivell d'eficàcia de les soques de BAL en el control de l'*E. amylovora* no es manté constant pels diferents òrgans de la planta (fruits immadurs, fulles i flors). Les soques de BAL eficaces en els tres òrgans estudiats van ser la TC54 i la TC92. Els agents de biocontrol de referència (EPS62e, AMP20017, C9-1, Serenade®) i estreptomina també van resultar eficients en tots els òrgans de la planta.
3. Les soques de BAL estudiades poden colonitzar i sobreviure en la superfície de flors de perera i pomera. Colonitzen les flors a humitat relativa alta (90%) i sobreviuen a humitat relativa baixa (50%).
4. Les tres soques de *L. plantarum* PM411, TC92 i TC54, van resultar efectives en la prevenció de la infecció *in vivo* en plantes de perera en contenidor; l'eficàcia va prendre valors semblants als de l'agent de biocontrol *B. subtilis* QST713 i l'estreptomina, per contra van ser menys efectius que *P. fluorescens* EPS62e i *P. vagans* C9-1.
5. Les soques de *L. plantarum* PM411, TC92 i TC54 són candidates apropiades per a un futur desenvolupament d'agents de biocontrol per la seva gran capacitat de colonització d'hostes.

5 BIBLIOGRAFIA

Beer, S.V. 2002. Fire Blight: 61-63. *Compendium of apple and pear diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. ISBN: 0-89054-109-4.

Badosa, E., Ferré, R., Planas, M., Feliu, L., Besalú, E., Cabrefiga, J., Bardají, E., Montesinos, E. 2007. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides*, 28: 2276-2285.

Bonaterra, A., Cabrefiga, J., Camps, J., Montesinos, E. 2007. *Increasing survival and efficacy of a bacterial biocontrol agent of fire blight of rosaceous plants by means of osmoadaptation*. FEMS Microbiology Ecology, 61: 185-195.

Cabrefiga, J. 2004. Tesi doctoral: *Fire blight (Erwinia amylovora) of rosaceous plants. Pathogen virulence and selection and characterization of biological control agents*. Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA). Universitat de Girona.

Cabrefica, J., Montesinos, E. 2005. Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopathology*, 95:1430-1437.

Daranas, N. 2011. Projecte Enginyeria Tècnica Agrícola: Determinació de l'eficàcia dels bacteris grampositius com a agents de control del foc bacterià. Universitat de Girona.

Daranas, N. 2013. Pràcticum Ciència i Tecnologia dels Aliments: Caracterització de soques de *Lactobacillus plantarum* com a agents de biocontrol d'*Erwinia amylovora*. Universitat de Girona.

Ferré, R., Badosa, E., Feliu, L., Planas, M., Montesinos, E., Brdají, E. P.L. 2006. Inhibition of plant pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3302-3308.

Generalitat de Catalunya. 2013. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. Agricultura. Sanitat vegetal [en línia]. Accessible a <http://www20.gencat.cat/portal/site/DAR.html> [consulta 11/10/2013]

López, M.M., Montesinos, E. 1996. Enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas: 515-558. G.Llácer, M.M. López, A. Trapero, A.Bello. *Patología Vegetal*. Sociedad Española de Fitopatología-Agropupli.Vol.1.ISBN: 84-921910-07.

López, M.M., Montesinos, E., Lecompte, P. Paulin.J.P. 1996. El fuego bacteriano del peral, una amenaza permanente: Situación actual, epidemiología y control de la enfermedad. *Fruticultura Profesional*, 78:79-87.

Mercader, G. 2012. Projecte Enginyeria Tècnica Agrícola: Activitat antimicrobiana de soques de bacteris de l'àcid làctic seleccionades per la presència del marcador molecular de producció de plantaricina. Universitat de Girona.

Monroc, S., Badosa, E., Besalú, E., Planas, M., Bardají, E., Montesinos E., Feliu, L. 2006a. Improvement of cyclic decapeptides against plant pathogenic bacteria using a combinatorial chemistry approach. *Peptides*, 27:2575-2584.

Montesinos, E., López, M.M. 2000. Fuego Bacteriano (*Erwinia amylovora*): 37-40. *Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso*. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN: 84-7114-916-8.

Montesinos, E. Moragrega, C., Ruz, L., Badosa, E., Bonaterra, A., Vilardell, P., Llorente, I., Cabrefiga, J., Francés. 2002. Nuevas estrategias en el control de las enfermedades bacterianas de los cultivos. *Phytoma España*. 138: 78-87.

Montesinos, E.; Llorente, I.; Badosa, E.; Cabrefiga, J.; Bonaterra, A.; Ruz, L.; Moragrega, C. i Francés, J. 2009a. Sistemas de predicció i métodos de control del fuego bacteriano. p. 75-90. A: Palacio-Bielsa, A; Cambra, M.A. i col. El fuego bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, Espanya. p. 95.

Montesinos, E.; Trias, R.; Bañeras, Ll.; Francés, J.; Cabrefiga, J.; Bonaterra, A. i Badosa, E. 2009b. Qualitat microbiològica dels productes vegetals frescos mínimament processats i desenvolupament de tecnologies de bioconservació mitjançant bacteris de l'àcid làctic. TECA (Associació Catalana de Ciències de l'alimentació), 11, 1, 3-9.

Palacio-Bielsa, A; Cambra, M.A; López, M.M; Ordax, M; Peñalver, J; Gorris, M.T; Cambra, M; Marco-Noales, E; Llop, P; Biosca, E; Roselló, M; Montesinos, E; Llorente, I; Badosa, E; Cabrefiga, J; Bonaterra, A; Ruz, L; Moragrega, C; Francés, J. i Díaz, C. 2009. El fuego bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, Espanya. p. 95.

Pusey, P.L. 1997. Crab Apple blossoms as model for research on biological control of fire blight. *Phytopathology*, 87, 1096-1102.

Roselló, G., Bonaterra, A., Francés, J., Montesinos, L., Badosa, E., Montesinos, E. 2013. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic. CIDSAB-XaRTA. Universitat de Girona.

RuralCat. 2013. La comunitat virtual agroalimentària i del món rural. Sanitat Vegetal: S'estableix una zona de seguretat al voltant dels focus del foc bacterià. Eradicació d'un focus de foc bacterià a Girona. [en línia] Accessible a: <http://www.ruralcat.net> [consulta 10/12/2013]

Ruz, L. 2003. Tesi doctoral: Improvement of strategies for the management of fire blight (*Erwinia amylovora*). Evaluation and optimization of physical and chemical control methods and use of decision support systems. Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA). Universitat de Girona.

Suriñach, A. 2011. Pràcticum Ciència i Tecnologia dels Aliments: Aïllament i selecció de bacteris de l'àcid làctic pel control biològic d'*E. amylovora*. Universitat de Girona.

Trias, R.; Bañeras, Ll.; Bados, E. i Montesinos, E. 2008a. Bioprotection of golden Delicious apple and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 50-60.

Trias, R.; Bañeras, Ll.; Montesinos, E. i Badosa, E. 2008b. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*, 11, 231-237.

Van Der Zwet, T., Beer, S.V. 1995. Fire Blight. Its nature, prevention and control: A practical guide to integrate disease management. United States Department of Agriculture. *Agriculture in formation bulletin*, 631, 83pp.

Visser, R., Holzappel, W.H i Bezuidenhout,J.J. 1986. Antagonism of Lactic Acid Bacteria against Phytopathogenic Bacteria. *Aplied and Environmental Microbiology*, 52 (3), 552-555.