



Universitat de Girona

ANÀLISI POLIFÀSICA DE SOQUES DE “PSEUDOMONAS FLUORESCENS” POTENCIALS AGENTS DE BIOCONTROL DE MALALTIES DE FRUITERS

Esther BADOSA ROMAÑÓ

ISBN: 84-688-8621-1

Dipòsit legal: GI-I 140-2004

<http://hdl.handle.net/10803/7779>

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

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

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



Universitat de Girona

Departament d'Enginyeria Química Agrària i Tecnologia Agroalimentària
Institut de Tecnologia Agroalimentària

TESI DOCTORAL

*Anàlisi polifàsica de soques de
Pseudomonas fluorescens potencials agents de
biocontrol en malalties de fruiters*

Memòria presentada per Esther Badosa i Romà, per a optar al títol
de Doctor per la Universitat de Girona

Girona, 2001



Universitat de Girona

EMILI MONTESINOS SEGUÍ,

Catedràtic de Producció Vegetal del Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària

CERTIFICA:

Que la llicenciada en Ciències Biològiques Esther Badosa i Romañó ha dut a terme, sota la seva direcció, el treball que, amb el títol “Anàlisi polifàsica de soques de *Pseudomonas fluorescens* potencials agents de biocontrol en malalties de fruiters”, presenta en aquesta memòria la qual constitueix la seva Tesi per a optar al Grau de Doctor per la Universitat de Girona.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, signem la present a Girona, 2 de juliol de 2001.

Dr. Emili Montesinos Seguí

It has been said that every novel idea in science passes through three stages. First people say isn't true, then they said it's true but not important, and finally they say it's true and important but not new.

Autor desconegut, citat a Greenberg (1997) i està imprès en: Harold, F.M. 1986. The vital force: a study of bioenergetics. W.H. Freeman and Co.. New York.

Per a la meva família (i en el meu record a la Maria i la Pilar)

Agraïments

Són molts els factors que han hagut de confluïr perquè la present memòria s'hagi pogut materialitzar. Entre aquests factors, la consolidació de la Universitat de Girona junt amb el meu contacte amb el grup de recerca de Patologia Vegetal, han estat dos dels pilars fonamentals.

Vull donar el meu més sincer agraïment a l'Emili Montesinos per confiar en mi i haver-me introduït en el món de la fitopatologia i la recerca i per tot l'ajut i suport durant la realització de la present memòria; així mateix vull agrair especialment a l'Anna Bonaterra el meu "bateig" en el camp del biocontrol. A l'Anna Bonaterra altra vegada i en Jaume Alemany, companys que treballen en varis aspectes del biocontrol amb els qui he passat moltes estones realitzant, posant en comú els resultats dels nostres treballs, cercant i compartint bibliografia i, tot s'ha de dir, amb qui he compartit els bons i els no tan bons resultats dels nostres respectius treballs. Gràcies Jordi, perquè a més d'haver-te incorporat en els treballs de biocontrol, també has hagut de ser l'informàtic en cap en la instal·lació i resolució dels problemes de programes que hem emprat conjuntament pels nostres respectius treballs (*bad path...*). Gràcies a tu també Lídia, per l'ajut en alguns dels aspectes del treball més relacionats amb la teva àrea d'expertesa.

En l'elaboració del treball he interaccionat amb molta gent de fora del departament, sense els que tota la feina realitzada hagués estat molt més feixuga. El meu agraïment a la Núria Gaju (per tot el seu suport), a en Xano (pel temps i les ganes en la posta a punt dels MRFLP-PFGE) i a la Vicky i en Sergi per ajudar-me en les meves estades a la Universitat Autònoma de Barcelona. Gràcies també a tots els qui han col·laborat amb diferents aspectes d'aquest treball i que formen part de les seccions de Microbiologia, Biologia Molecular i Genètica de la Facultat de Ciències de la UdG. Vull agrair especialment a en Toni Benito i en Jordi Viñes pel seu ajut i suport. Gràcies també a la Laia, Javi, Jordi i Vicenç per rebre'm sempre amb un somriure.

Agraïda estic a tots els investigadors (Hill, S.; Défago, G.; Raaijmakers, J.; Neindemam, M.; Fakhouri, W; Bailey, M.J.; Tomashow, L.; López, M.M.) i a les col·leccions de cultius CECT i CFBP que ens han tramès les soques de referència emprades en el nostre treball.

Vull agrair a l'Elena Saguer el seu ajut incondicional i sense fronteres i a la Sussi pel seu ajut en els tràmits burocràtics i en general a tots els companys del grup de recerca Lusi, Carmen, Jesús, Josep Lluís, Pere, Isidre, Cun, Olga, Núria, Gemma i Elena i als companys de la secció de Tecnologia d'Aliments: Carme, Dolors, Mònica, Anna M^a, i Lucero pels molts "dia a dia" que hem compartit fins ara (i que puguem compartir-ne molts més!!!).

Finalment, agraeixo la comprensió de la meva família que sempre m'ha fet costat en tot el que ha calgut (i sóc conscient de que això no ha estat ni de bon tros senzill..).

Per a la realització d'aquesta Tesi Doctoral, he gaudit d'una beca del programa de Doctoral Microbiologia i Bioquímica aplicada de la Universitat de Girona. El treball que representa aquesta memòria s'ha realitzat en el marc de les ajudes a Grups de Recerca Consolidats (SGR) amb Refs. 1996SGR00025, 1998SGR00093 i 2000SGR00095, amb fons del Centre de Referència en Tecnologia dels aliments (CeRTA) de la comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT) de la Generalitat de Catalunya destinats a la Unitat de Tecnologia Agroalimentària (TAG), i també amb el projecte "Estudios epidemiológicos y evaluación de estrategias de control integrado del fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) en España" del Programa Nacional de Investigación y Desarrollo Agrario de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT).

Resum

Molts bacteris del grup fluorescent del gènere *Pseudomonas* són capaços de controlar malalties de les plantes causades per fongs i bacteris fitopatògens (ACBs) o mostren activitat com a bacteris promotors del creixement de les plantes (BPCPs). S'han descrit diversos metabòlits que intervenen de manera important en la seva activitat com a ACBs i BPCPs entre els quals en destaquen el 2,4-diacetilfloroglucinol (PhI), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA), Pirrolnitrina (Prn), àcid cianhídric (HCN), àcid 3-indolacètic (IAA), sideròfors i quitinases.

L'objectiu principal del nostre treball ha estat la comparació de les característiques d'un grup de *Pseudomonas* del grup fluorescent utilitzant una aproximació polifàsica amb la finalitat d'establir possibles relacions entre algunes de les característiques i la capacitat d'actuar com a ACB o BPCP.

Atesa la importància en el biocontrol de la producció de metabòlits com PhI, PCA i Prn, l'objectiu preliminar ha estat la recerca i obtenció de soques productores d'aquests metabòlits. Per assolir aquest objectiu s'ha emprat una aproximació molecular basada en la detecció dels gens biosintètics implicats en la seva producció en lloc de la detecció directa dels metabòlits per evitar els efectes que poden tenir les condicions de cultiu en la inducció o repressió de la seva síntesi. S'han realitzat diferents protocols basats (i) en la cerca assistida de productors mitjançant l'ús de marcadors fenotípics i posterior confirmació per PCR i, (ii) en l'ús de la PCR per a la detecció dels gens directament dels extractes bacterians, d'enriquiments d'aquests extractes i la realització de la hibridació en colònies per al posterior aïllament. La cerca assistida de productors de PhI mitjançant marcadors fenotípics i posteriorment la utilització de tècniques moleculars (amplificació per PCR del gen *phlD*), ha estat el millor mètode en el tipus de mostres processades en el nostre treball, on la proporció de productors és relativament baixa. En total s'han aïllat a partir de diversos ambients 4 soques portadores dels gens de la síntesi de PCA, 15 de PhI i 1 de Prn.

S'ha constituït una col·lecció de 72 soques de *Pseudomonas* del grup fluorescent que inclou 18 aïllats propis portadors dels gens biosintètics necessaris per la producció de PhI PCA i Prn; 6 soques de referència procedents de col·leccions de cultius tipus, 14 soques productores dels diferents antibiòtics cedides per altres investigadors i una selecció de 34 soques procedents d'un treball previ realitzat en el nostre grup de recerca. A la col·lecció s'hi troben soques candidates a ACB i BPCP de diverses malalties i plantes.

Les 72 soques s'han caracteritzat fenotípicament i genotípicament. La caracterització fenotípicament s'ha portat a terme mitjançant la identificació a nivell d'espècie amb galeries API 20NE i proves bioquímiques específiques; la producció de metabòlits com PCA, PhI, Prn, IAA, HCN, quitinases i sideròfors mitjançant l'ús de diferents tècniques; antagonisme *in vitro* en diversos medis enfront

dos fongs (*Stemphylium vesicarium* i *Penicillium expansum*) i tres bacteris fitopatògens (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*); l'eficàcia de la inhibició de la infecció en bioassaigs *in vivo* sobre material vegetal enfront els fongs *P. expansum* en poma i *S. vesicarium* en fulles de perera i enfront el bacteri *E. amylovora* en fruits immadurs de perera i, finalment, en assaigs de promoció de creixement en dos portaempelts comercials de *Prunus*. Cal destacar que *P. expansum* causa la podridura blava en pomes i peres en postcollita, *S. vesicarium* la taca bruna de la perera i *E. amylovora* el foc bacterià de les rosàcies.

El nombre de soques de *Pseudomonas*, sobre el total de les 72 estudiades, productores d'IAA (4) i quitinases (6) és baix, mentre que és elevat en el cas del HCN (32), que a més està associat a la producció de PhI. Els resultats obtinguts en l'antagonisme *in vitro* han mostrat en el cas dels bacteris que és dependent del patògen indicador i del medi de cultiu. La presència o absència de ferro no sembla ser un factor que potenciï l'antagonisme. En el cas dels fongs no s'ha observat però, influència del medi de cultiu emprat. En el total de 72 soques s'ha observat un percentatge baix de soques que manifesten antagonisme en tots els medis assajats vers 3 o 4 dels patògens (7). Solament 2 d'aquestes 7 soques han mostrat ser també efectives en bioassaigs d'inhibició de les infeccions causades per 2 dels 3 patògens assajats. Algunes de les soques efectives en els bioassaigs no són antagonistes *in vitro* en cap dels medis assajats enfront el mateix patògen. En el cas de la promoció del creixement, s'han observat més soques promotores del creixement del portaempelts de prunera Marianna 2624 que no en l'híbrid de presseguer-ametller GF677 i les eficàcies assolides són també majors en el cas de Marianna 2624, detectant una elevada especificitat soca/portaempelts

La caracterització genotípica s'ha realitzat mitjançant l'anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció de DNA ribosomal (RFLP-rDNA) i l'anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de macrorestricció genòmica de DNA cromosòmic separats per electroforesi en camp polsant (MRFLP-PFGE). Ambdues anàlisis van mostrar una gran heterogeneïtat genètica entre les soques caracteritzades i no s'ha pogut relacionar les agrupacions obtingudes amb les característiques fenotípiques o capacitat d'actuar com a ACB o BPCP. Els patrons de macrorestricció genòmica (MRFLP-PFGE) del bacteri model *P. fluorescens* EPS288 són estables en el temps i independents de les condicions de cultiu assajades al laboratori o en mostres naturals, mostrant ser una tècnica eficaç en la identificació de reaïllats de mostres naturals inoculades prèviament amb el bacteri.

Una selecció de soques que comparteixen el fet de produir floriglucinol s'han caracteritzat mitjançant RFLP i seqüenciació del gen *phlD*. S'ha establert una relació entre les agrupacions obtingudes en les anàlisis RFLP-rDNA, RFLP-*phlD* i les seqüències del gen. En l'anàlisi filogenètica de les seqüències del gen *phlD* s'ha observat un elevat grau de polimorfisme obtenint-se 3 agrupacions principals. Les agrupacions semblen relacionar-se amb els patrons de producció

de metabòlits (PhI, HCN i Prn en una primera agrupació; PhI i HCN en la segona i solament PhI en la tercera), però aquestes no s'han pogut relacionar amb l'origen geogràfic de les soques o la seva activitat com a ACBs i/o BPCP.

Amb les dades obtingudes de la caracterització fenotípica i genotípica s'ha realitzat una anàlisi multivariant (correspondències, correlacions d'Spearman i de freqüències amb variables categòriques). S'ha demostrat la importància de disposar d'una tècnica que permeti depurar una col·lecció de soques descartant les soques genèticament idèntiques, ja que influeixen en els resultats de les anàlisis. Pels tres patògens assajats com a indicadors i els dos portaempelts emprats, no s'ha observat cap correlació entre la inhibició de la infecció o la promoció del creixement amb les característiques fenotípiques i genotípiques de les soques que fos significatiu i consistent en les tres tècniques emprades.

Abstract

Many bacteria pertaining to the fluorescent *Pseudomonas* group are able to control plant diseases caused by bacterial and fungal plant pathogens (BCAs). Also, some of them exhibit activity as plant growth promoting bacteria (PGPBs). Several metabolites like 2,4-diacetylphloroglucinol (PHL), phenazin-1-carboxylic acid (PCA), pyrrolnitrin (Prn), hydrogen cyanide (HCN), indol-3-acetic acid, siderophores and chitinases has been described accounting for their ability of being BCAs or PGPBs.

The aim of the present work was to compare the phenotypic and genotypic characteristics of a selected group of fluorescent *Pseudomonas* by means of a polyphasic approach in order to establish relationships with the ability of being BCA and PGPB.

Due to the importance of production of metabolites like Phl, PCA and Prn in biocontrol, the preliminary objective of this work was to search and isolate of metabolite producing strains. To achieve this objective a molecular approach was used based on the detection of biosynthetic genes, which are implicated in the metabolite production, instead of direct detection of the metabolites. The procedure was performed to avoid the effect of culture conditions on induction or repression of metabolite synthesis.

Two procedures were used (i) assisted search of metabolite producing strains by means of phenotypic markers and subsequent confirmation by PCR analysis, (2) direct use of PCR for gene detection in direct extracts or enrichments from samples and subsequent colony-hybridization for assistance in strain isolation. The best method for isolation of Phl producers in the type of samples processed in the present work, where the frequency of Phl producers is very low, was the assisted search by means of phenotypic markers followed of a confirmation by PCR amplification of phlD gene. Four strains harboring the PCA genes, 15 strains with Phl genes, and one with Prn genes were isolated.

A collection of 72 strains of *Pseudomonas* pertaining to the fluorescent group was made including 18 isolates derived from the present work which harbor the biosynthetic genes for Phl, PCA and Prn production; 6 strains from reference collections; 14 strains producing several antibiotics which were supplied by other colleagues; and a selection of 34 strains from a previous work performed by our research group. Within the collection there are many strains with promising potential as BCAs and PGPBs of several diseases and plant hosts.

The collection was characterized phenotypically and genotypically. The phenotypic characterization included identification at the species level with the aid of API20NE kit and several specific biochemical tests; the production of metabolites such as PCA, Phl, Prn, IAA, HCN, chitinases and

siderophores; *in vitro* antagonism in several culture media against two fungi (*Stemphylium vesicarium* and *Penicillium expansum*) and three bacterial pathogens (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*); efficacy in bioassays of inhibition of infection of plant material by *P. expansum* on apple fruit tissue and *S. vesicarium* on pear leaves, *E. amylovora* on immature pear fruit, and of growth promotion in two commercial *Prunus* rootstocks. *P. expansum* causes blue mold rot of apple and pear in postharvest, *S. vesicarium* cause brown spot of pear and *E. amylovora* is the causal agent of fire blight of rosaceous plants.

The number of strains, over a total of 72 studied, producing IAA and chitinases was very low (4 producing IAA and 6 producing chitinases), whereas a high number of HCN producing strains (32) was detected which was associated to PhI production. *In vitro* antagonism against bacteria was highly dependent on indicator pathogen and growth medium, but the presence or absence of iron did not seem to affect. However, in the case of antagonism against fungi, no influence of the medium composition was observed. Among the collection a low frequency of strains exhibiting antagonism against 3 or 4 pathogens a total of 7 strains was observed in all tested media. Only two out of the seven strains were effective in infection inhibition bioassays caused by two of the three pathogens tested. Some of the effective strains in the *in vivo* assays were not antagonist for the indicator pathogen in any of the media tested. In the case of plant growth promoting strains, the growth in rootstock Marianna 2624 was more stimulated than in GF677, and there was a strain-host specificity.

Genotypic characterization of strains was performed by means of restriction fragment length polymorphism analysis of the ribosomal DNA (RFLP-rDNA) and macrorestriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal DNA separated by pulsed field gel electrophoresis (MRFLP-PFGE). Both techniques showed a high level of genotypic diversity within the collection of strains, and no relationships were observed between clusters and phenotypic characteristics or ability to be BCA or PGPB. Patterns of MRFLP-PFGE for the model bacterium *P. fluorescens* EPS288 were found stable within time and independent of cultivation conditions in the laboratory or under natural conditions. Therefore the method is highly suitable for identification of strains reisolated from natural samples previously inoculated with the bacterium.

A further selection of strains which produce phloroglucinol were characterized by RFLP analysis and *phlD* sequencing. The groups observed were consistent among the RFLP-rDNA, RFLP-*phlD* and gene sequence data. Phylogenetic analysis obtained using *phlD* sequences showed a high level of polymorphism revealing three main clusters. These clusters appear to be related with metabolite production: a first cluster producing PhI, HCN and Prn, a second producing PhI and HCN, and a third producing only PhI. However, these groups were related neither to the geographic origin of strains nor to the activity as BCA or PGPB.

A multivariate analysis (correspondence, pairwise Spearman rank correlation, and frequency analysis) was performed using data of phenotypic and genotypic characterization of strains. The results emphasize the importance of discarding from the database those strains being genetically identical because skew the final results. The three types of analysis did not revealed a significant and consistent relationship between the activity of infection inhibition or growth promotion of the strains and their characteristics.

Abreviatures

- ACBs** (*BioControl Agents*): agents de control biològic
- AHL** (*acyl homoserine lactone*): acil homoserines lactones
- AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*): polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats selectivament per PCR de fragments de restricció genòmica
- ARDRA** (*Amplified Restriction DNA Ribosomal Analysis*): anàlisi dels patrons de restricció de DNA ribosomal amplificat per PCR
- BPCP** (*Plant Growth Promoting Bacteria*): bacteris promotors del creixement en plantes
- CHEF** (*Contour-Clamped Homogeneous Electric Field*): electroforesi de camp elèctric perifèric homogeni
- DNA** (*Deoxyribonucleic acid*): àcid desoxiribonucleic
- DNAsa** (*Deoxyribonuclease*): desoxiribonucleasa
- FIGE** (*Field Inversion Gel Electrophoresis*): electroforesi d'inversió de camp
- gac/Gac** (*gene/protein of two component regulatory system. Global antibiotics and cyanide control*): gen/proteïna del sistema regulador de dos components. Control global de la producció d'antibiòtics i cianhídric
- GPF** (*Green Fluorescent proteins*): proteïnes verdes fluorescents
- GMM** (*Genetically Modified Microorganisms*): microorganismes modificats genèticament
- HPLC** (*High pressure liquid chromatography*): cromatografia líquida d'alta pressió
- HR** (*Hypersensitive response*): Resposta hipersensible
- IAA** (*indole-3-acetic acid*): àcid 3-indolacètic
- INA** (*Ice Nucleation Active*): activitat de nucleació de gel
- ISR** (*Systemic Induced Resistance*): Resistència induïda sistèmica
- ITS** (*Internal Transcribed Spacer*): espai intern transcrit
- Kb** (*Kilobases*): Kilobases
- LAR** (*Localized Acquired Resistance*): Resistència adquirida localitzada
- MRFLPs** (*Macrorestriction fragment length polymorphism*): polimorfismes en la longitud dels macrofragments de restricció genòmica
- Mg** (*Megabases*): Megabases
- OFAGE** (*Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis*): electroforesi amb alternança de camp ortogonal
- pb** (*base pairs*): parells de bases
- PCA** (*phenazine-1-carboxylic acid*): àcid fenazin-1-carboxílic
- PCR** (*Polymerase Chain Reaction*): reacció en cadena de la polimerasa
- PFGE** (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*): electroforesi en camp polsant

PhI (*2-4-diacetylphloroglucinol*): 2,4-diacetilfloroglucinol

Plt (*pyoluteorin*): pioluteorina

Prn (*pyrrolnitrin*): pirrolnitrina

PRs (*Pathogenesis Related Proteins*): proteïnes relacionades amb la patogènesi

RPCP (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*): rizobacteris promotors del creixement en plantes

RAP-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA-PCR*): polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats per PCR amb encebadors arbitraris

rep-PCR (*length polymorphism amplified fragments using primers complementary to repetitive highly conserved sequences; ERIC, BOC, Rep*): polimorfismes en la longitud dels fragments d'amplificació múltiple definida amb encebadors de seqüències altament conservades; ERIC, BOX i Rep

RFE (*Rotating Field Electrophoresis*): electroforesi de camp rotatiu

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*): polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció

RNA (*ribonucleic acid*): àcid ribonucleic

rRNA (*ribosomal ribonucleic acid*): àcid ribonucleic ribosomal

rDNA (*ribosomal deoxyribonucleic acid*): àcid ribonucleic ribosomal

SA (*Salicylic Acid*): àcid salicilic

SAR (*Systemic Acquired Resistance*): Resistència adquirida sistèmica

SD (*Dice coefficient*): coeficient de similitud de Dice

TAFE (*Transverse Alternating Field Electrophoresis*): electroforesi de camp alternant transversal

TLC (*Thin layer chromatography*): cromatografia en capa fina

Capítol 1. Introducció

1.1 El control biològic i els sistemes tradicionals de control de les malalties de les plantes

1.1.1 Els sistemes tradicionals de control	1
1.1.2 Problemàtica del control de malalties d'importància econòmica en producció i postcollita dels fruiters	3
1.1.3 El control biològic com a alternativa	6
1.1.3.1 Mecanismes d'acció dels agents de biocontrol	8
1.1.3.2 Mètodes de prospecció d'agents de biocontrol	15
1.1.3.3 Factors que afecten l'eficàcia dels processos de biocontrol	18
1.1.3.4 Seguiment i traçabilitat dels agents de biocontrol	21

1.2 El gènere *Pseudomonas* com a font d'agents de biocontrol.....25

1.2.1 El gènere <i>Pseudomonas</i> i l'espècie <i>P. fluorescens</i>	25
1.2.2 Estat actual del biocontrol de malalties amb bacteris del gènere <i>Pseudomonas</i>	31
1.2.3 L'antibiosi com a mecanisme de biocontrol	34
1.2.3.1 Metabòlits produïts per <i>Pseudomonas</i>	34
1.2.3.2 Regulació i anàlisi genètica de la producció d'antibiòtics en <i>Pseudomonas</i>	37

1.3 La recerca de marcadors fenotípics i genotípics específics relacionats amb la capacitat de biocontrol en soques de *Pseudomonas*..... 41

1.3.1 La caracterització genòmica. Aplicació a l'estudi de bacteris actius en el control biològic de malalties.....	43
1.3.1.1 Mètodes dependents de l'amplificació per PCR	47
1.3.1.2 Mètodes independents de l'amplificació per PCR	52
1.3.2 Caracterització subespecífica de bacteris mitjançant el polimorfisme dels fragments de macrorestricció genòmica del DNA.....	52

1.4 Objectius generals..... 61

Capítol 2. Selecció assistida d'agents de biocontrol mitjançant l'ús de marcadors moleculars

2.1 Introducció

2.1.1 Aïllament i prospecció de bacteris candidats a ACBs	65
2.1.2 Aplicació de la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) en la recerca de soques de <i>Pseudomonas</i> productores dels antibiòtics 2,4-diacetilfloroglucinol, àcid fenzin-1-carboxílic i pirrolnitrina	66
2.1.3 Principals antibiòtics d'interès en el biocontrol.....	67
2.1.4 Objectius	68

2.2 Material i mètodes

2.2.1 Aïllament de bacteris epífits.....	69
2.2.2 Disseny d'encebadors per a la detecció de gens biosintètics de la pirrolnitrina (Prn).....	69
2.2.3 Detecció de la presència dels gens biosintètics dels antibiòtics 2,4-diacetilfloroglucinol (PhI), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) i pirrolnitrina (Prn) en aïllats de <i>Pseudomonas</i> (sensu stricto)	70
2.2.3.1 Soques utilitzades	70
2.2.3.2 Detecció per PCR dels gens biosintètics de PhI, PCA i Prn	71
2.2.4 Avaluació de diferents estratègies per a la detecció de bacteris productors potencials dels antibiòtics floroglucinol i àcid fenazin-1-carboxílic en mostres naturals ⁷⁵	
2.2.4.1 Protocol A.....	77
2.2.4.2 Protocol B.....	80

2.3 Resultats

2.3.1 Aïllament de bacteris epífits.....	89
2.3.2 Disseny d'uns encebadors per a la detecció dels gens biosintètics de la pirrolnitrina (Prn)	92
2.3.3 Detecció de la presència dels gens biosintètics dels antibiòtics 2,4-diacetilfloroglucinol (PhI), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) i Pirrolnitrina (Prn) en una col·lecció d'aïllats de <i>Pseudomonas</i> (sensu stricto)	94
2.3.4 Avaluació de diferents estratègies per a la detecció de bacteris portadors dels gens biosintètics dels antibiòtics floroglucinol i àcid fenazin-1-carboxílic en mostres naturals.....	100
2.3.4.1 Protocol A.....	101
2.3.4.2 Protocol B.....	103

2.4 Discussió..... 107

2.4.1 Aïllament de bacteris epífits.....	107
2.4.2 Disseny d'uns encebadors per a la detecció dels gens biosintètics de la pirrolnitrina (Prn)	107
2.4.3. Detecció de la presència dels gens biosintètics dels antibiòtics 2,4-diacetilfloroglucinol (PhI), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) i Pirrolnitrina (Prn) en una col·lecció d'aïllats de <i>Pseudomonas</i> (sensu stricto)	109
2.4.4 Avaluació d'estratègies per a la detecció de bacteris productors potencials dels antibiòtics floroglucinol (PhI) i àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) en mostres naturals	112

Capítol 3. Caracterització fenotípica

3.1 Introducció..... 121

3.1.1 Identificació dels aïllats de <i>Pseudomonas</i> a nivell d'espècie	121
3.1.2 Metabòlits i compostos que poden estar implicats en la capacitat d'actuar com a BPCPs i ACBs.....	123
3.1.3 Objectius.....	128

3.2 Material i mètodes

3.2.1 Aïllats i soques emprades en el treball	129
3.2.2. Caracterització i identificació.....	130
3.2.2.1 Identificació a nivell d'espècie	130
3.2.2.2 Proves complementàries. Patogenicitat en tabac i activitat nucleadora de gel	133
3.2.3 Determinació de la producció de metabòlits	134
3.2.3.1 Producció de sideròfors, quitinases, àcid 3- indolacètic i àcid cianhídric.....	134
3.2.3.2 Producció de floroglucinol (Phl), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) i pirrolnitrina (Prn)	136
3.2.4 Espectre d'antagonisme <i>in vitro</i> , bioassaigs d'inhibició d'infeccions i activitat promotora del creixement vegetal.....	138
3.2.4.1 Espectre d'antagonisme <i>in vitro</i>	138
3.2.4.2 Bioassaigs d'inhibició de les infeccions causades per diversos bacteris i fongs fitopatògens indicadors	140
3.2.4.3 Bioassaigs de promoció del creixement en plantes.....	143

3.3 Resultats

3.3.1 Identificació mitjançant galeries API 20NE, proves bioquímiques i fisiològiques. Hipersensibilitat en tabac (HR) i activitat nucleadora del gel (INA).....	145
3.3.2 Producció de metabòlits	
3.3.2.1. Sideròfors, quitinases, àcid 3-indolacètic i cianhídric	152
3.3.2.2 Floroglucinol, àcid fenazin-1-carboxílic i pirrolnitrina	154
3.3.3 Espectre d'antagonisme <i>in vitro</i> , bioassaigs d'inhibició d'infeccions per diversos bacteris i fongs fitopatògens, i promoció del creixement vegetal	
3.3.3.1 Espectre d'activitat antagonista <i>in vitro</i>	157
3.3.3.2 Bioassaigs d'inhibició d'infeccions.....	162
3.3.3.3 Bioassaigs de promoció de creixement vegetal	166

3.4 Discussió

3.4.1 Identificació mitjançant galeries API 20NE i altres proves bioquímiques i fisiològiques.....	169
3.4.2 Producció de metabòlits.....	173
3.4.3 Espectre d'antagonisme <i>in vitro</i> , inhibició d'infeccions per diversos bacteris i fongs fitopatògens, i promoció del creixement vegetal	176

Capítol 4. Caracterització genotípica

4.1 Introducció

4.1.1 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR del 16S rDNA i de l'espai intergènic entre el 16S i 23S rDNA (RFLP-PCR- rDNA).....	187
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

4.1.2 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de macrorestricció genòmica generats amb l'ús d'enzims de restricció de tall poc freqüent i separats amb l'electroforesi en camp polsant (MRFLP-PFGE)	188
4.1.3 Objectius	190

4.2 Material i mètodes

4.2.1 Soques utilitzades	191
4.2.2 Caracterització genotípica	191
4.2.2.1 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR del 16S rDNA i de l'espai intergènic entre el 16S i 23S rDNA (RFLP-PCR- rDNA)	191
4.2.2.2 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de macrorestricció genòmica generats amb enzims de restricció de tall poc freqüent i separats amb electroforesi en camp polsant (MRFLP-PFGE)	198
4.2.3 Estudi de l'estabilitat del patró de MRFLP-PFGE i aplicació a la identificació d'una soca bacteriana inoculada i reaïllada	205
4.2.3.1 Estabilitat del patró en condicions de laboratori	205
4.2.3.2 Identificació de <i>P. fluorescens</i> EPS288 reaïllada a partir de mostres naturals i diversos materials inoculats	205
4.2.4 Caracterització genotípica d'un grup de soques productores de l'antibiòtic floroglucinol... 208	
4.2.4.1 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR del gen <i>phlD</i> (RFLP- <i>phlD</i>)	208
4.2.4.2 Seqüenciació	209

4.3 Resultats

4.3.1 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció d'amplificats d'rDNA	213
4.3.2 Anàlisi dels fragments de macrorestricció genòmica generats amb l'ús d'enzims de restricció de tall poc freqüent i separats amb electroforesi en camp polsant.....	232
4.3.3 Avaluació de la tècnica PFGE per a la identificació d'una soca reaïllada després d'inoculada	255
4.3.4 Caracterització genòmica d'un grup de soques productores de floroglucinol mitjançant RFLP-PCR- rDNA, MRFLP-PFGE, RFLP-PCR i seqüenciació del gen <i>phlD</i>	259

4.4 Discussió

4.4.1 Anàlisi RFLP-PCR-rDNA	273
4.4.2 Anàlisi MRFLP-PFGE	276
4.4.3 Diversitat genotípica de les soques productores de floroglucinol.....	282

Capítol 5. Anàlisi polifàsica

5.1 Introducció	
5.1.1 Anàlisi polifàsica	289
5.1.2 Objectius	291
5.2 Material i mètodes	
5.2.1 Dades emprades.....	293
5.2.2 Anàlisi estadístic	293
5.3 Resultats	297
5.4 Discussió.....	307
Conclusions.....	313
Bibliografia.....	315
Annexes	
Annex 1.....	i
Annex 2.....	v
Annex 3.....	ix
Annex 4.....	xi
Annex 5.....	xxiii

Capítol 1 Introducció

1.1 El control biològic i els sistemes tradicionals de control de les malalties de les plantes

1.1.1 Els sistemes tradicionals de control

En els darrers anys, el sistema convencional de control de les malalties de vegetals causades per microorganismes fitopatògens s'ha dut a terme amb l'aplicació de tractaments amb antimicrobians químics. Aquests tractaments, que s'han utilitzat cada vegada més de forma sistemàtica, han permès un augment notable de la producció agrícola comportant alhora un seguit d'efectes negatius com ara l'acumulació de residus, la contaminació de l'ambient, efectes col·laterals no desitjats en la microbiota natural i, a més, la selecció de resistències per part dels patògens enfront els productes, obligant a augmentar el nombre d'aplicacions. Avui en dia, però, s'està enregistrant una regressió en el nombre de productes químics que poden utilitzar-se degut a les restriccions governamentals (De Waad i col. 1993). Aquestes restriccions venen donades principalment per la seva ecotoxicitat o pel contingut de components implicats en la carcinogènesi en alguns dels pesticides comercialitzats (Herrera i Chet 1998). En aquest sentit, les mesures governamentals estan dirigides principalment a la reducció del nivell de residus en els aliments i el medi ambient (Ragsdale i Sisler 1994, Sutton 1996).

El consell de la UE en les directrius 76/895/CEE i 90/642/CEE i la modificació d'ambdues en la 93/58/CEE, intenta uniformitzar les legislacions entre els diferents estats que en formen part i s'està plantejant no autoritzar de nou el registre de més del 50% de les matèries actives que actualment estan autoritzades (Gullino i Kuijpers 1994, Hall i Barry 1995). Aquesta problemàtica ha donat lloc al plantejament de diferents mètodes com a sistemes de suport, per tal de disminuir l'ús d'aquests compostos químics de síntesi, amb l'objectiu de complir amb les directrius i de tendir cap a la producció integrada i l'agricultura sostenible (Avilla i col. 1996). Cal destacar que hi ha mètodes que no són ben bé alternatius, sinó que van encaminats a la racionalització de les aplicacions dels productes, és a dir, a disminuir el nombre de tractaments utilitzant els anomenats sistemes predictius del risc d'infecció. Podem citar per exemple el sistema MARYBLIT en el foc bacterià (Steiner 1989) i el BSPcast per a la taca bruna de la perera (Montesinos i col. 1995, 1996b, Llorente i col. 2000). Altres alternatives són la utilització de mètodes físics com la temperatura, solarització, el conreu de varietats resistents a la malaltia o, en tot cas, menys susceptibles i inclusivament l'ús de plantes transgèniques resistents gràcies a les manipulacions genètiques que actualment estan a l'abast de la biologia molecular. Un altre dels mètodes alternatius més importants és el control biològic o biocontrol, basat en l'ús de microorganismes que

són beneficiosos en la seva tasca per combatre el patògen, anomenant-se genèricament ACBs (Agents de Control Biològic).

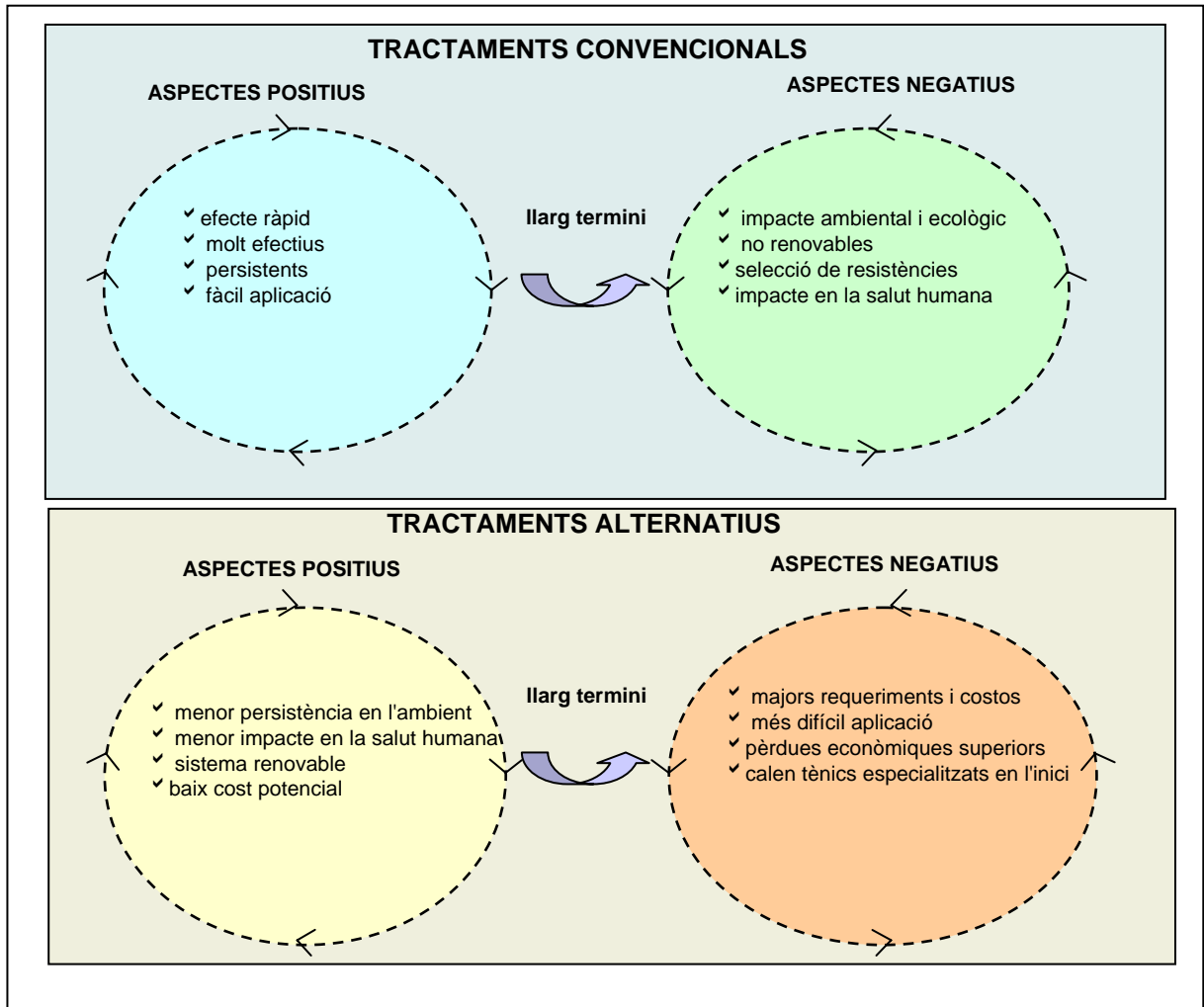


Figura 1.1 Aspectes positius i negatius a llarg termini dels tractaments convencionals enfront dels alternatius.
Figure 1.1 Integrated feedback mechanisms for conventional and alternative control of plant diseases.

A la figura 1.1 es resumeixen els avantatges i inconvenients del control químic convencional enfront d'altres alternatives. Els sistemes convencionals de control basats en l'ús de productes químics proporcionen una efectivitat molt elevada amb resultats quasi immediats. Si tenim en compte que, a més, protegeixen durant un cert període de temps al ser molt persistents i que l'aplicació està molt estandarditzada amb l'ús de la maquinària agrícola, es pot entendre la comoditat que comporta a l'agricultor l'ús d'aquests sistemes. Aquests avantatges, però, comporten a llarg termini tot un seguit d'efectes negatius com ara l'impacte ambiental, en la salut humana i la selecció de patògens resistents al producte després d'una aplicació molt continuada. Si valorem els principals avantatges de l'ús d'altres alternatives de control, haurem de tenir present que, si bé són sistemes renovables amb un cost potencialment baix, un impacte en la salut humana i en el medi ambient molt menor, els resultats no són tan ràpids i efectius com els dels tractaments convencionals. Cal tenir en compte, però, que aquests sistemes alternatius necessiten

en l'inici tècnics especialitzats i un període d'implantació llarg al mateix temps que poden comportar més requeriments i costos econòmics com a resultat de les pèrdues en les collites que són superiors a les dels sistemes tradicionals.

1.1.2 Problemàtica del control de malalties d'importància econòmica en producció i postcollita dels fruiters

A Europa, la producció de fruita de llavor té una gran importància econòmica, i en l'estat Espanyol Catalunya n'és la principal comunitat productora. En el grup de recerca en que s'ha realitzat aquest treball, s'està treballant en diferents orientacions en el control de les malalties que afecten la producció i postcollita de poma i pera. Aquestes malalties representen un problema per les grans pèrdues econòmiques que poden donar lloc per l'agricultor tant en producció com en postcollita de fruita. Pel que fa referència a les bacteriosis, la gran capacitat de multiplicació dels bacteris fitopatògens, el seu cicle vegetatiu simple i el fet que acostumen a ser residents epífits i/o endòfits fa que aquestes malalties siguin molt severes i virulentes. Entre les bacteriosis més importants cal destacar la necrosi bacteriana dels borrons de la perera associada a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i el foc bacterià causat per *Erwinia amylovora* en perera i pomera. De les malalties fúngiques en producció de peres podem citar com a més important la taca bruna de la perera causada per *Stemphylium vesicarium* i en postcollita la podridura blava causada per *Penicillium expansum* (Montesinos i col. 2000).

La necrosi dels borrons de flors de la perera és una malaltia d'etiologia complexa, els estudis realitzats han mostrat que s'ha de tenir en compte la implicació del bacteri *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* així com altres desequilibris com el dessecament foliar a l'estiu durant la inducció floral i probablement també intervinguin altres factors com l'estat nutricional de l'hoste (Montesinos y Vilardell 1991, 1996; Hirano i Upper 2000). *P. syringae* pv. *syringae* és un bacteri Gram negatiu que es pot trobar com a població epífita en la superfície de la planta i ser la font d'inòcul en el moment en que les condicions són favorables i es pot iniciar la infecció (Wilson i Lindow 1994a, Hirano i Upper 1994) i també pot trobar-se de forma endòfita (Whitesides i Spots 1991)

La necrosi bacteriana de la perera es manifesta amb uns símptomes diferents depenent del teixit o òrgan afectat i de l'estat vegetatiu de l'hoste. El dessecament dels borrons es presenta a la tardor i primavera, no mostrant-se símptomes durant l'estiu. Els símptomes més típics es donen a la primavera i en l'època de floració de les pereres mostrant-se unes necrosis localitzades en flors, fruits immadurs i fulles. Els borrons es dessequen fins a perdre les escates i bràctees més externes, amb la posterior caiguda, que provoca pèrdues importants de fruits repercutint en l'economia del fructicultor (Montesinos i Vilardell 1988). La patogenicitat de *P. syringae* pv. *syringae* rau en la seva capacitat d'activitat nucleadora de gel (INA⁺) a temperatures per sota els 0°C (donant lloc a la destrucció dels teixits vegetals) i la producció de diverses fitotoxines com la siringomicina (Kaku 1966, Gross 1991).

Els mètodes químics més utilitzats per al seu control són els derivats de coure com el brou bordelès i els antibiòtics si la legislació ho permet (kasugamicina, ploxioxinina, estreptomina i tetraciclina) a més de diversos fosfonats com el fasetil d'alumini i derivats de l'àcid fosfònic (Moragrega 1997). Hi ha també productes químics que eviten la formació de l'activitat nucleadora del gel, que presenten però, una elevada fitotoxicitat que els fa incompatibles amb el tractament foliar.

El foc bacterià és una de les malalties més serioses que afecten les pereres i pomeres i altres plantes de la família de les rosàcies (Epton i col. 1994; Van der Zwet i col. 1998, Vanneste 2000). El foc bacterià pot afectar tots els òrgans de la planta i sovint va acompanyat de la seva mort. La severitat de la malaltia rau en el seu caràcter destructiu, la rapidesa en que porta a terme aquesta destrucció i a la seva distribució sistèmica en la planta. La intensitat de la malaltia varia d'estació en estació i també pot variar en diferents anys.

L'agent causant de la malaltia, és el bacteri Gram negatiu *Erwinia amylovora* que es pot trobar de forma epífita o endòfita en la planta o com exsudats en les ferides i xancre (Van der Zwet 1994). A l'hivern, el bacteri sobreviu principalment en els marges de les necrosis i xancre però moltes vegades pel damunt de les necrosis, la planta és completament asimptomàtica. A la primavera, el bacteri es multiplica en el teixit infectat i des d'allà es pot disseminar per mitja de diferents agents com insectes i ocells infectant altres plantes a través d'obertures naturals com són els estomes, els nectaris o ferides. El símptoma més característic d'aquesta bacteriosi és l'aspecte cremat de les fulles de les plantes infectades, que ha donat lloc al nom de foc bacterià. Si bé els símptomes de la malaltia són orientatius, no són suficients per determinar-la donat que es poden confondre, sobre tot en els primers estadis de la infecció, amb els símptomes de la infecció causada per *P. syringae* pv. *syringae* o per atacs d'algun insecte com *Janus* (López i col.1996, Montesinos i Llorente 1999). Els primers símptomes del foc bacterià apareixen generalment a la primavera en l'època de la floració i a partir de la colonització del corimbe floral, la malaltia va progressant pel peduncle i fulles, els brots tendres es marceixen agafant la forma de gaiata de pastor i a partir d'aquí, progressivament, es va assecant l'arbre. Tot i que els mecanismes de la seva patogenicitat encara no es comprenen completament, sembla que hi ha dos substàncies produïdes pel bacteri que tenen relació amb aquesta patogenicitat: l'amilovorina (un heteropolisacàrid acídic) i una harpina.

Actualment no hi ha mètodes efectius pel control del foc bacterià i cal combinar diferents mesures per a poder eliminar o reduir l'inòcul. Entre els preparats químics que s'utilitzen, podem citar com a més importants els compostos derivats del coure (principalment el brou bordelès), altres que contenen antibiòtics en els llocs on la legislació ho permet, (estreptomina, oxitetraciclina i kasugamicina) i productes fosfonats (Sobieczewski i col. 1997, Schnabel i Jones 1999, Jones i Schnabel 2000, Psallidas i Tsiantos 2000).

L'estemfiliosi de la perera es coneix també com la taca bruna de la pera i a Catalunya és una malaltia molt associada a zones humides afectant també altres zones frutícoles del Sud d'Europa com Itàlia (Ponti i Laffi 1988) i França (Cugier i Humbert 1991).

L'agent causant de la malaltia és el fong deuteromicet *Stemphylium vesicarium* (el teleomorf del qual és l'ascomicet *Pleospora alli*). El seu cicle biològic se caracteritza per l'alternança de la fase hivernal en la forma sexual *Pleospora alli* (reproducció per ascoespores) en les restes de fullaraca i fruits caiguts al sòl i la forma asexual *S. vesicarium* (reproducció per conidis) en condicions favorables (Llorente 1997).

Els símptomes de la malaltia es poden veure tant en fruits com en fulles, pecíols i en menys freqüència en els brots herbacis, on poden observar-se unes necrosis de color bru-negrós, generalment envoltades d'un halo vermellós. En el cas dels fruits, aquestes taques provoquen la pèrdua del seu valor comercial i per tant una gran pèrdua econòmica pel fructicultor. Les infeccions es produeixen a través de obertures naturals de la planta com són els estomes, les lenticel·les per l'acció d'una toxina necrotitzant sintetitzada pel fong. La malaltia se sol detectar cap a finals de maig, principis de juny en les fulles i cap a finals de juny en els fruits. La malaltia va progressant d'una forma continuada i la màxima severitat es dona en el moment de la recol·lecció dels fruits.

Els mètodes de control químic emprats pel seu control, impliquen aplicacions setmanals o per quinzenes depenent de la matèria activa i/o formulació. Els tractaments que han mostrat millors resultats són els ditiocarbamats (TMTD, mancozeb) aplicats cada setmana, les dicarboximides aplicades cada quinzena i el tebuconazol i captan juntament amb una barreja del Fosetil d'alumini i coure (Montesinos i col. 1996b).

La podridura blava causada pel patogen de ferida *Penicillium* és la malaltia de postcollita més important en pomes i peres durant la conservació. L'aspecte de les podridures amb el creixement del fong, és d'un color blau-verdós degut a l'agrupació de les espores, que es el que ha donat lloc al nom de podridura blava .

Si bé *Penicillium* ha estat aïllat a camp, es molt rar que pugui observar-se la malaltia a camp, exceptuant el cas de que els fruits estiguin en el sòl. Les infeccions solen tenir lloc durant la collita i posteriors manipulacions en els llocs d'emmagatzematge. L'origen de les infeccions es pot trobar en l'ambient i/o en les solucions de rentat a que es sotmeten els fruits abans de la conservació (Francés 2000).

El fong penetra en els fruits a través de les obertures naturals com les lenticel·les o a través de ferides per la manipulació i si la infecció es produeix a través del pecíol, es podreix el cor del fruit. Si bé *Penicillium* es desenvolupa més bé en ambients humits i càlids, la infecció pot donar-se a temperatures de 0 °C si bé la podridura progressa més lentament.

Els tractaments que solen aplicar-se en postcollita pel control de la podridura blava durant la conservació són tractaments aplicats abans de l'emmagatzematge dels fruits en cambres. Els productes se solen aplicar mitjançant dutxes o banys amb aigua i fungicides, essent els més emprats l'imazalil, folpet i tiabendazol (Viñas i col. 1996, Francés 2000).

1.1.3 El control biològic com a alternativa

El biocontrol és fonamentalment una aplicació ecològica, l'objectiu de la qual està encaminat cap a la utilització d'un/s microorganisme/s que actui/n en contra del patogen, que de manera natural impedeixen o disminueixen el seu desenvolupament. Els microorganismes capaços de portar a terme el biocontrol s'anomenen genèricament Agents de Control Biològic (ACBs). El control biològic ha estat estudiat per als patògens del sistema radical de les plantes (Weller 1988, Bakker i col. 1991, Handelsman i Stabb 1996, Bagnasco i col. 1998), de la part aèria (Blakeman i Fokkema 1982, Andrews 1992, Montesinos i col. 1996a, Wilson M. 1997) i en el control de malalties de postcollita (Wilson i Wisniewski 1989, Francés i col. 1997, El-Ghaouth 1997, Chalutz i Droby 1998, Janisiewicz 1998, Juan 1999, Francés 2000).

La darrera definició de control biològic presentada per l'Acadèmia Nacional de les Ciències dels Estats Units, el defineix com "l'ús d'organismes naturals o modificats, gens o productes gènics, per reduir els efectes d'organismes indesitjables i per afavorir els organismes desitjables en cultius, arbres, animals, insectes i microorganismes beneficiosos" (NAS 1987, citat per Thomashow i Weller 1996). Cal tenir en compte que en aquesta definició s'inclouen, per tant, les manipulacions genètiques que actualment estan a l'abast de les tècniques de la Biologia Molecular i, en aquest sentit, també s'està plantejant l'ús d'agents de biocontrol conjuntament amb plantes transgèniques per cercar un efecte sinèrgic (Lottman i col. 2000).

Un dels punts claus en el desenvolupament del control biològic va raure en la descripció dels primers sòls supressius de *Fusarium* a Amèrica Central durant la dècada dels seixanta per Stover (1962). En un sòl supressiu els patògens no són capaços d'establir-se i provocar la malaltia o bé inicialment la provoquen però la incidència d'aquesta disminueix amb el cultiu continuat. Uns anys més tard que Stover, Louvet i col. (1976), van establir la naturalesa microbiana del fenomen i entre els anys 1980-85 es van suggerir ja alguns mecanismes per explicar la supressió de la malaltia com ara la competició pel ferro o per fonts de carboni (Alabouvette i col. 1985). El primer gran èxit en la recerca del control biològic aplicat al control de les malalties del sistema radical, va raure en l'acurat estudi dels sòls supressius, on la disminució en la incidència de malalties d'aquests sòls (oposadament als anomenats sòls conductors de la malaltia) es va provar que tenia un origen biològic, identificant-se un alt nombre de microorganismes que presentaven capacitat biocontroladora (Weller 1983).

Si bé no sempre és cert, el control biològic s'ha mostrat menys consistent que el químic, degut a que el biocontrol és més dependent dels factors ambientals donat que s'hi estableixen un seguit d'interaccions molt complexes entre patogen, planta hoste, ACB i medi ambient (Weller 1988, Edwards i col. 1994). El control biològic que s'assoleix en els sòls supressius ha mostrat ser més consistent i estable que no els descrits amb una sola soca d'un ACB aïllat d'aquest mateix sòl i involucrat en la supressió de la malaltia, mostrant doncs la gran importància de totes les interaccions que es donen en el sistema (Alabouvette i Lemanceau 1999). Cal remarcar, però, que avui en dia la biologia molecular i la genètica han proporcionat noves metodologies per comprendre els mecanismes que utilitzen els ACBs, permetent alhora l'avaluació del comportament dels ACBs inoculats en ambients naturals fins a un lílindar que abans no era possible. Malgrat tot, donada la complexitat d'aquestes interaccions hi ha dos motius principals que poden explicar la inconsistència en l'activitat dels microorganismes introduïts com a ACBs, retardant el seu desenvolupament comercial i el seu ús a gran escala: la inadequada colonització del lloc on es volen emprar i la variabilitat en l'expressió o en el nivell d'activitat dels mecanismes responsables de la supressió del patogen (Thomashow i Weller 1996).

Segons Froyd (1997) i Butt i col. (1999) hi ha també dues raons principals que poden explicar les inversions menors en la recerca i desenvolupament d'ACBs respecte als productes químics: el fet que fins ara, l'aplicació pràctica ha estat limitada a pocs productes comercials efectius enfront d'un nombre limitat de patògens i en uns pocs cultius i la ja citada inconsistència observada en el camp. En el cas del biocontrol en la part aèria, encara hi ha més problemes pel que fa referència a la dificultat d'aplicació de l'ACB, doncs és necessària la utilització de sistemes de polvorització o atomització i calen surfactants i humectants per aconseguir una bona deposició i distribució del producte (Wilson C.L.1997).

Per a la superació dels problemes plantejats en l'ús del biocontrol, s'estan aplicant extensivament les metodologies desenvolupades en els darrers anys per a la detecció i estudi de les comunitats microbianes així com per al coneixement de les interaccions que s'estableixen entre l'entorn dinàmic, l'ACB, el patogen i la planta hoste.

Un altre procés relacionat en part amb el biocontrol és la promoció del creixement vegetal. Des de que es van començar a estudiar, cap a mitjans de la dècada dels 70, els microorganismes que es mostraven implicats positivament en el desenvolupament de la planta i per tant en l'augment de la producció del cultiu i que majoritàriament eren de la part radical (rizobacteris) se'ls va anomenar amb el nom de rizobacteris promotors del creixement de les plantes (RPCP). En aquests inicis, el descobriment de que molts dels microorganismes, sobretot bacteris del gènere *Pseudomonas* promovien indirectament el creixement de la planta controlant els patògens, va propiciar que s'emprés també el terme RPCP per descriure el grup de microorganismes que realitzaven biocontrol; més endavant es va començar a emprar el terme d'agents de biocontrol (ACBs) (Kloepper 1992, Inbar i col. 1994, Bashan i Holguin 1998).

En l'actualitat, sembla que no hi ha una separació molt clara entre els microorganismes que promouen el creixement de les plantes (RPCPs) i els microorganismes emprats en el control biològic (ACBs). Segons Kloeper (1992), ACBs i RPCPs haurien de ser entesos com les dues cares d'una mateixa moneda, ja que bacteris que inicialment han estat seleccionats per avaluar-ne l'activitat biocontroladora s'han mostrat a més com a promotors del creixement en absència del patògen i a l'inrevés. Per aquest autor, la promoció del creixement de les plantes es deu en el cas dels RPCPs a la producció de metabòlits que promouen directament el creixement de la planta, sense interaccions amb la microbiota indígena. Contràriament, els ACBs, incrementen indirectament el creixement de la planta mitjançant el biocontrol dels patògens a través de la producció d'antibiòtics, sideròfors o HCN, que disminueixen l'activitat del patògen. Darrerament alguns autors creuen que l'ús del terme RPCPs ha creat massa confusió i han proposat la distinció, dins els RPCPs, dels bacteris agents de biocontrol i promotors del creixement de les plantes (ACBs-BPCPS) i dels bacteris promotors del creixement de les plantes (BPCP) (Bashan i Holguin, 1998). Aquests darrers autors canvien el terme rizobacteris pel de bacteris en general donat que molts bacteris beneficiosos no són de la rizosfera i, per tant, caldria la utilització del terme bacteri en general. En el cas de bacteris que suprimeixen el patògen per la producció de substàncies inhibidores o incrementant la resistència de la planta, s'hauria d'emprar el terme ACBs-BPCPs.

Pel que fa referència als bacteris capaços de realitzar control biològic, s'han descrit més de 20 gèneres que poden desenvolupar antagonisme enfront diversos patògens. Es poden citar com a més importants els gèneres *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Amorphosporangium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cellulomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia* (*Pantoea*), *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* i *Xanthomonas* (Cook i Baker 1983). Entre els bacteris, els Gram positius no han estat molt estudiats, malgrat l'avantatge que representa la seva capacitat de formar endoespores, sobretot comparativament amb els Gram negatius, i tenint en compte la gran experiència assolida en la formulació i producció a gran escala de Gram positius en la indústria. Alguns autors creuen que aquest fet pot ser en part degut a que han estat menys idonis per a la realització d'estudis genètics i a que els mecanismes pels quals suprimeixen les malalties són molt poc coneguts (Emmert i Handelsman 1999). Actualment, però, s'estan realitzant treballs amb Gram positius, destacant els realitzats amb membres del gènere *Bacillus* (Walker i col. 1998, Yoshida i col. 2001).

1.1.3.1 Mecanismes d'acció dels agents de biocontrol

El biocontrol s'ha estudiat en la part aèria, en el sistema radical de les plantes i en postcollita de fruita i hortalisses. Entre els diferents ambients en que es pot portar a terme el biocontrol, hi ha algunes diferències; per exemple, al parlar de biocontrol en la part aèria s'ha de tenir en compte

que intervenen molts factors abiòtics com són la disponibilitat de nutrients i aigua, la temperatura, la radiació ultraviolada i/o la deposició de substàncies agroquímiques que poden variar molt en temps relativament curts, en contrast amb el sòl, que és més amortidor. A més, la disponibilitat de nutrients pels microorganismes és poc estable en la part aèria i moltes vegades depèn de les aportacions de nutrients exògens a la planta, com el pol·len, les flors i els exsudats o secretats per insectes. En contrast, a la part radical la major part de nutrients procedeixen dels exsudats de les arrels i del contingut de matèria orgànica del propi sòl, alhora que les condicions abiòtiques no són tan variables en períodes de temps curts. Finalment, en el cas de postcollita, les condicions abiòtiques són també més estables en comparació amb la part aèria

Els mecanismes emprats pels microorganismes responsables del control biològic són molt diversos i de fet no hi ha molta variació en els ACBs independentment de si provenen de la part aèria, sistema radical o postcollita. En la gran majoria de casos és la síntesi de compostos antimicrobians la que proporciona la capacitat d'inhibir el patogen. En menor nombre de casos es troben els que inhibeixen per competència (per llocs concrets de colonització o nutrients) i, finalment, els que estimulen les respostes de defensa de l'hoste. El coneixement del mecanisme implicat en el biocontrol és important per poder assegurar la selecció del millor candidat a ACB. Un gran nombre de vegades, però, no és un sol el mecanisme implicat en el biocontrol sinó que és el resultat de tot un conjunt de trets de la soca bacteriana.

Antagonisme directe del patogen: parasitisme o predació, antibiosi i competència

L'antagonisme directe implica la interacció entre els dos microorganismes, el patogen i l'ACB, que comparteixen el mateix nínxol ecològic. Es poden definir com a interaccions directes el parasitisme, la producció d'antibiòtics i la competició per nutrients o pel nínxol ecològic. Aquest antagonisme directe sol donar-se durant la fase sapròfita o epífita del patogen contribuint a la reducció de la densitat de l'inòcul i/o al creixement del patogen (Alabouvette i Lemanceau 1999).

El parasitisme normalment és més freqüent en fongs i hi ha poca evidència que sigui un mecanisme important en el cas dels bacteris. Tots els anomenats "fongs veritables" contenen a la paret cel·lular un polímer derivat de N-acetilglucosamina anomenat quitina. El parasitisme es realitza freqüentment per la destrucció d'aquestes parets per l'acció d'enzims lítics com les quitinases i β -glucanases, i depèn d'un estret contacte entre l'antagonista i l'hoste. Aquest procés no és ràpid i normalment es requereix un període de temps llarg per observar els resultats.

El parasitisme és un dels principals mecanismes involucrats en el biocontrol per part d'alguns fongs (Manocha i Govindsamy 1998), com *Trichoderma harzianum* (Elad i col. 1982, Lorito i col. 1993, Haran i col. 1996, Tronsmo i Hieljord 1998, Limon i col. 1999), *Talaromyces flavus* (Madi i col. 1997) o *Stachybotrys elegans* (Tweddell i col. 1994).

En el cas dels bacteris s'ha estudiat també la importància d'aquest mecanisme (Frädberg i Shnürer 1998, Shingh i col. 1999, Zhang i Yuen 2000, Zhang i col. 2001). Entre les espècies que produeixen compostos amb activitat quitinolítica cal destacar, els Gram positius, amb el gènere *Bacillus* (Trachuk i col. 1996) i, en els Gram negatius, les espècies *Serratia marcescens* (Chet i col. 1990), *P. fluorescens* (Gaffney i col. 1993, Nielsen i col. 1998, Nielsen i Sorensen, 1999), *P. aeruginosa* (Wang i Chang 1997), *P. stutzeri* (Lim i Kim 1991), *Pantoea agglomerans* (Chernin i col. 1995, 1997) i *Enterobacter cloacae* (Lorito i col. 1993).

L'antibiosi és l'antagonisme resultant de la producció de metabòlits secundaris tòxics per a un altre microorganisme, inhibint el seu desenvolupament o provocant la seva mort. Els antibiòtics són compostos de baix pes molecular produïts per organismes vius o sintetitzats artificialment, que a concentracions baixes aconseguen inhibir el creixement o l'activitat metabòlica d'altres microorganismes (Fravel 1988).

Potser els microorganismes productors d'antibiòtics han estat els primers en ser considerats en la recerca d'ACBs perquè la seva capacitat d'inhibició del patògen sol quedar patent en assaigs *in vitro* mesurant les zones d'inhibició produïdes per l'ACB en cultius sòlids confluents del patògen. Paral·lelament a la recerca de nous ACBs, s'han descobert i elucidat l'estructura de nous antibiòtics que han estat la base per obtenir antibiòtics sintètics com els fungicides del grup dels fenilpirròls desenvolupats arran del descobriment de la pirrolnitrina produïda per *P. pyrrocina* (Arima i col. 1964, De Waard i col. 1993, Knight i col. 1997).

La producció de metabòlits secundaris amb activitat antibiòtica és comú a molts microorganismes. L'efecte de la producció d'antibiòtics per part d'un ACB mostra molta similitud a l'ús de productes químics i, per això, a vegades es tendeix a considerar els ACBs com a merament sistemes de control químic. S'ha de tenir en compte, però, que la quantitat d'antibiòtic produït és dependent de la concentració de microorganismes i de les condicions ambientals. També s'ha de tenir en compte la inestabilitat de molts antibiòtics produïts en condicions de camp dificultant la seva presència continuada en les superfícies a protegir.

Són molt rars els llevats i els fongs que han estat utilitzats com a ACBs per la seva capacitat de producció d'antibiòtics, tot i que hi alguns llevats i fongs productors d'aquests compostos (Ghisalberti i Rowland 1993, McCormak i col. 1994, Hannusch i Boland 1996). S'ha descrit, per exemple, que *Trichoderma* produeix els antibiòtics tricondermina, dermadina i un àcid gras monobàsic insaturat, que són actius envers molts bacteris i fongs (Monte i col. 2000).

Si bé l'antibiosi és un dels mecanismes més ben estudiat, el principal problema per determinar la seva importància en el camp és la quantificació de l'antibiòtic en el lloc d'acció, és a dir, *in situ*. El desenvolupament i refinament de protocols i de tècniques suficientment sensibles per detectar l'antibiòtic, de manera que s'eliminin components que interfereixen en la quantificació per

cromatografia líquida d'alta pressió, com són els àcids húmics i fúlvics, han permès com en el cas de *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ demostrar la producció de l'antibiòtic 2,4-diacetilfloroglucinol (PhI) en la rizosfera del blat a camp (Bonsall i col. 1997). L'ús d'aquestes tècniques ha permès també mostrar la relació entre la quantitat de PhI produït per *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ i la supressió de la malaltia del "Take-all" del blat observada a camp (Raaijmakers i col. 1999a).

Dins l'antibiosi també s'inclou la producció de compostos volàtils com el HCN. El HCN es produït per molts rizobacteris i la primera hipòtesi que es va apuntar del modus d'actuació va ser que l'estrès provocat en la planta pel HCN estimulava els seus mecanismes de defensa. En el cas de *P. fluorescens* CHA0 en plantes de tabac es produeixen alteracions en les activitats fisiològiques en la planta com l'estimulació de la formació de pèls en les arrels (Voisard i col. 1989).

La competició per nutrients i l'exclusió competitiva són uns mecanismes adequats en el procés del biocontrol quan el patògen és sensible a l'estrès nutricional i pels que el desenvolupament de la malaltia pot ser estimulada per nutrients presents en el lloc d'infecció. La competició per nutrients i l'antibiosi no són excloents, ja que l'estrès produït per la competició pot augmentar la susceptibilitat als antibiòtics (Cullen i Andrews 1984). Un exemple d'aquest mecanisme s'ha descrit en el cas de malalties en la germinació de les llavors de pèsol causades per *Phytophthora ultimum*. En aquest patosistema s'ha vist que les llavors al germinar alliberen acetaldehid i etanol que estimulen el creixement del fong. Si s'hi troba present la soca de *P. putida* N1R que utilitza l'etanol es redueix d'una manera significativa la concentració de volàtils en el sòl interferint en la germinació de les espores del patògen (Paulitz 1991). Aquesta competència es mostra molt vàlida en el cas dels fongs necròtrofs, però en el cas de patògens biòtrofs com els rovells i mildius, aquests no es veuen afectats per l'estrès de nutrients (Köhl i Fokkema 1998) ja que obtenen els aliments de cèl·lules vives sense causar perjudicis greus en els primers estadis. Un altre sistema on s'ha demostrat que el mecanisme de biocontrol és la competició per nutrients (en aquest cas per àcids grassos insaturats de la planta) ha estat el de l'ACB *Enterobacter cloacae* enfront *Pythium ultimum* (van Dijk i Nelson 2000).

Quant a l'exclusió del nínxol ecològic, pot succeir que l'antagonista ocupi un nínxol ecològic que s'imbrui amb el del patògen prevenint l'establiment d'aquest últim. En els danys per gelada causats per soques de *P. syringae* actives en la nucleació del gel (INA⁺), l'aplicació de *P. syringae* (INA⁻), *Erwinia herbicola* o *P. fluorescens* A506 ha mostrat ser efectiva en el control de la malaltia excloent altres *P. syringae* (INA⁺) presents (Lindow i col. 1983, Lindow 1987, Wilson i Lindow 1994b). En el cas del foc bacterià, l'aplicació en els pistils i borrons de perera d'una soca d'*E. herbicola* sembla que exclou el patògen *E. amylovora*, probablement perquè utilitza un nutrient limitant del creixement pel patògen (Wilson i col. 1992). En el cas del foc bacterià també s'han realitzat estudis amb mutants avirulents, òbviament amb el mateix nínxol ecològic que el patògen, per tal de protegir enfront de la soca virulenta (Tharaud i col. 1997).

Sovint, però, aquest mecanisme és l'última opció que s'investiga en el procés de selecció d'ACBs i

se sol fer quan els altres mecanismes no semblen estar-hi involucrats. Malgrat tot, ja s'estan desenvolupant nous mètodes senzills per avaluar la competició de nutrients com a mecanisme de control biològic. Per exemple, Janisiewicz i col. (2000) han descrit una metodologia per determinar la competició per nutrients en el cas de podridures en pomes causades per *Penicillium expansum* en postcollita per part d'un ACB, consistent en l'avaluació de la germinació dels conidis dipositats en uns microcilindres que en la base tenen una membrana permeable al suc de poma on està creixent l'antagonista.

Que aquest mecanisme sigui l'últim mecanisme que s'ha investigat, no és indicatiu de la importància que pot tenir en un determinat sistema, sinó del fet que les tècniques moleculars actuals han permès molt més els estudis dels mecanismes on sols hi ha un o pocs productes implicats com en el cas de l'antibiosi (Köhl i Fokkema 1998).

El ferro és un element essencial per al creixement dels microorganismes, en especial dels patògens, ja que està present en cofactors necessaris en les reaccions d'oxidació-reducció del metabolisme microbià. En l'ambient el ferro es troba com a ió fèrric (Fe^{3+}) el qual és virtualment insoluble en presència d'oxigen i no està disponible per als bacteris. Els sideròfors són compostos quelants de Fe^{3+} que interaccionen amb proteïnes receptores de la membrana que els reconeixen per poder incorporar el complex sideròfor-ferro. Els sideròfors produïts pel gènere *Pseudomonas* són molt afins amb el Fe^{3+} (Weger i col. 1986). Si la producció de sideròfors i/o el coeficient d'unió pel ferro per part del patògen fos menor que per a l'ACB, aquest fet implicaria la no disponibilitat del ferro per al patògen. Kloepper i col. (1980) van ser els primers en demostrar la importància de la producció de sideròfors en els mecanismes de biocontrol, tot i que aquest no és sempre el principal modus d'acció (Hamdan i col. 1991). Alguns treballs han anat encaminats a veure la influència que representa l'ús de sideròfors d'altres espècies membres del gènere *Pseudomonas* i inclusivament de membres de la família *Enterobacteriaceae* en l'eficiència de colonització de la part radical, emprant mutants no productors de pioverdines però que poden incorporar pioverdines d'altres bacteris (Loper i Henkels 1999, Mirleau i col. 2000). També s'han realitzat proves a l'inrevés, és a dir, introduint en una soca bacteriana receptors de sideròfors aliens amb l'objectiu d'augmentar l'eficiència en el biocontrol de la part radical (Moënne-Loccoz i col. 1996). A vegades, però, els sideròfors poden actuar com a mecanisme de biocontrol de forma indirecta, aquest és el cas d'un soca de *P. fluorescens* enfront a *Thielaviopsis basicola* on el mecanisme de control ha mostrat ser la cianogènesi, ja que en la síntesi del HCN cal una gran quantitat de ferro (Keel i col. 1989).

Antagonisme indirecte del patògen mitjançat per la planta. Resistència Induïda

Totes les plantes presenten mecanismes de defensa enfront els patògens que en alguns casos són constitutius i en altres casos són induïbles. Malgrat tot, aquests mecanismes són relativament ineficients quan la planta és infectada per un patògen virulent compatible, perquè el patògen evita

la inducció de les reaccions de resistència i defensa o bé perquè evadeix l'efecte d'aquestes defenses activades.

Es defineix com a Resistència Induïda (IR) o adquirida (AR) a la resposta de la planta enfront a microorganismes o agents químics que estimulen la protecció de la planta gràcies a la creació de barreres físiques i químiques.

La AR és pot expressar localment en el lloc d'inoculació anomenant-se Resistència Adquirida Localitzada (LAR) o bé propagar-se a teixits llunyans del lloc d'inoculació, és a dir, sistèmicament, rebent el nom de Resistència Adquirida Sistèmica (SAR). En la defensa activa de la planta es sintetitzen estructures de deposició en la paret cel·lular (callosa, lignina), noves barreres fisiològiques o fitoalexines i/o productes antimicrobians, i s'acumulen proteïnes relacionades amb la patogènesi (PRs) com són les quitinases i β -glucanases. Entre els determinants de la SAR podem citar a part dels microorganismes patògens, els fosfats, l'àcid 2,6-dicloroisonicotínic (INA), compostos orgànics naturals com els àcids oleïc, linoleïc, altres compostos sintètics com el propenazol i l'àcid benzo(1,2,3) thiadiazol-7-carbothioic S-metil-ester (BTH) (Görlach i col. 1996, Durner i col. 1997, Tally i col. 1999). Entre els senyals més importants en l'activació de la resistència induïda s'han descrit l'àcid salicílic (SA), jasmonats, etilè i senyals elèctrics (Kessmann i col. 1994, Sticher i col. 1997, De Meyer i col. 1999a, 1999b, Hammerschmidt i Smith-Becker 1999, Spletzer i Enyedi 1999, Van Wees i col. 2000).

Si bé SAR i LAR són similars pel que fa referència a la seva efectivitat enfront patògens, sembla que en el cas de la LAR els senyals que propaguen la resposta defensiva a tota la planta no estan presents (van Loon i col. 1998, Costet i col. 1999).

Els rizobacteris no patògens poden induir una resistència sistèmica en plantes, que fenotípicament és molt semblant a la SAR; a aquesta resistència induïda en que els rizobacteris actuen de mediadors se l'ha anomenat Resistència Induïda Sistèmica (ISR). El principal avantatge d'aquest mecanisme rau en que un cop la resistència ha estat induïda no es requereix una concentració elevada de la població del microorganisme inductor (Hoffland i col. 1996, Zimand i col. 1996, De Meyer i col. 1998). Si bé molts rizobacteris que activen la ISR també poden inhibir directament el creixement dels patògens, la seva capacitat de supressió de la malaltia pot involucrar més d'un mecanisme. A diferència de la SAR, que ha estat descrita en moltes espècies de plantes, la ISR s'ha concentrat en poques espècies i, per exemple, no s'ha descrit encara en monocotiledònies (van Loon i col. 1998).

En el cas de la ISR els determinants que provoquen la resposta poden ser lipopolisacàrids de membrana del bacteri inductor com en el cas de *P. fluorescens* WCS417 en rave (van Peer i col. 1991, Raaijmakers i col. 1995, Dekkers i col. 2000), sideròfors en el cas de *P. fluorescens* CHA0 en tabac (Maurhofer i col. 1994), i àcid salicílic en *P. fluorescens* CHA0 en tabac i en *P.*

aeruginosa 7NSKZ en mongeta (de Meyer i col. 1999a,1999b, Maurhofer i col. 1998). Quant als senyals que propaguen la resposta defensiva a tota la planta, sembla que hi ha camins dependents i altres d'independents de l'acumulació d'àcid salicílic (SA) (Pieterse i col. 1996, Pieterse i van Loon 1999). En la transducció del senyal intervenen l'àcid jasmònic i l'etilè com en la SAR, tot i que es creu que alguns gens activats per la resposta ISR són compartits amb la SAR, sembla que hi pot haver gens específics de la ISR (Staswick i Lehman 1999). A la figura 1.2 es mostra l'esquema proposat en el model d'*Arabidopsis* per la SAR i la ISR segons van Loon i col. (1998).

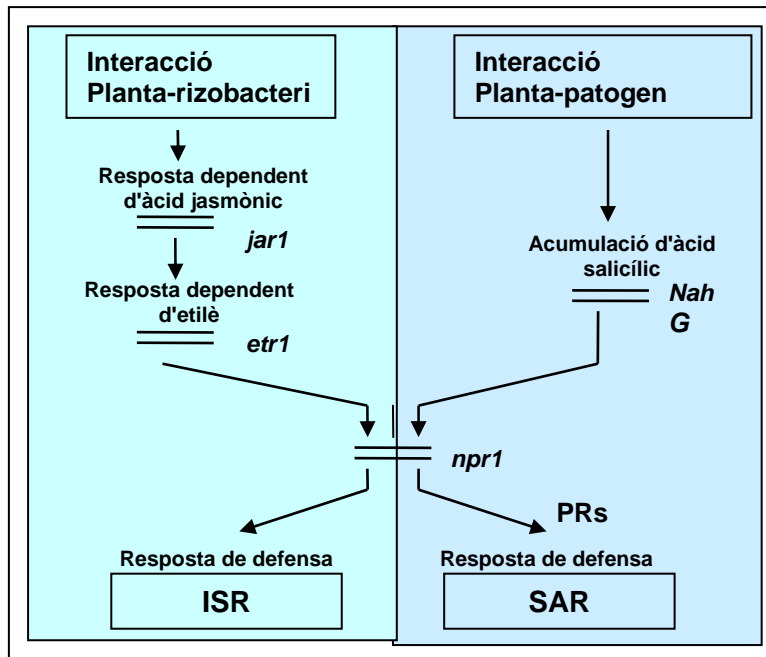


Figura 1.2 Transducció del senyal en la resistència adquirida sistèmica induïda per patògens (SAR) i la resistència sistèmica induïda per rizobacteris en *Arabidopsis*. En plantes diferents a *Arabidopsis* els rizobacteris productors d'àcid salicílic poden provocar la SAR i la ISR. Font: redibuixat de van Loon i col. 1998
Figure 1.2 Signal transduction pathways leading to pathogen-induced systemic acquired resistance (SAR) and rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis*. In plant species other than *Arabidopsis*, salicylic acid produced by rhizobacteria can trigger the SAR pathway as well as ISR. From: redrawn from van Loon i col.1998

Entre els rizobacteris, el gènere que s'ha estudiat més en l'activació de la ISR ha estat *Pseudomonas*. La qüestió rau en determinar si la resistència induïda mitjançant *Pseudomonas* no patògenes involucra els mateixos processos bioquímics en la planta, com l'acumulació de proteïnes relacionades amb la patogènesi (PRs) que en la SAR està induïda per agents abiòtics i microorganismes que causen necrosi (van Wees i col. 2000). En algun cas s'ha vist que hi ha relació entre l'acumulació de SA i PRs (Maurhofer i col. 1998, Tuzun i Bent 1998), però en altres casos l'expressió de PRs sembla ser independent de l'acumulació de SA (Pieterse i col. 1996, Pieterse i van Loon 1999). Altres autors opinen que l'acumulació de SA hi pot estar involucrada d'una manera indirecta (Chen i col. 1999) i pot succeir, per exemple, que un rizobacteri que sigui productor de SA el que provoqui sigui realment la resposta SAR de la planta (van Loon i col.1998). Actualment, l'estudi d'aquest mecanisme ha assolit una gran importància i s'estan portant a terme

treballs d'identificació dels gens implicats en les respostes de defensa de la planta, sobretot en *Arabidopsis* (Gupta i col. 2000). L'ús de plantes transgèniques facilita considerablement l'estudi dels senyals que es creu hi estan implicats (SA, jasmònic, etilè) que modulen l'activació de les MAP quinases (Durner i col. 1997, Kumar i Klessig 2000). També s'han realitzat treballs amb la sobreexpressió de gens que codifiquen per quitinases i glucanases i inclusivament amb mutants del patogen que presenten una patogenicitat reduïda per posar de manifest l'increment dels mecanismes de defensa (Durner i col. 1997, Yakoby i col. 2001). Amb els resultats obtinguts en aquests treballs es postula l'existència d'una xarxa complexa de comunicació i d'interrelacions amb altres sistemes de comunicació de la planta (Bowler i Fluhr 2000). Paral·lelament s'han estat desenvolupant assaigs cada vegada més ràpids per seleccionar microorganismes que activin la ISR (Han i col. 2000).

1.1.3.2 Mètodes de prospecció d'agents de biocontrol

La complexitat de les interaccions que tenen lloc en el procés de biocontrol així com l'ampli ventall de condicions ambientals en que pot desenvolupar-se, fa que sigui preferible cercar soques que estiguin adaptades al sistema on volen emprar-se. Contràriament a la creença de que els microorganismes autòctons són els millor adaptats per portar a terme el biocontrol, hi ha exemples d'ACBs que han estat seleccionats en llocs diferents als que actuen com a biocontroladors (Cullen i Andrews 1984, Andrews 1992, Montesinos i col. 1996a).

Els mètodes de prospecció han de ser ràpids per tal de permetre provar el màxim nombre d'aïllats i alhora han de reproduir al màxim les condicions naturals on intervinguin els tres organismes implicats: l'hoste, el patogen i el potencial ACB (Handelsman i col. 1990). Un dels mètodes de prospecció més utilitzat es basa en la realització d'una primera selecció de possibles candidats *in vitro* mitjançant la interacció directa entre cultius purs de l'ACB i del patogen. Permet treballar amb un gran nombre de soques, és ràpid i econòmic però, malauradament, en els experiments realitzats només hi ha la interacció entre el patogen i l'agent de biocontrol, de manera que els resultats que s'obtenen, normalment, no estan correlacionats amb els resultats que s'obtenen amb material vegetal (Bonaterra 1995, 1997, Ellis i col. 2000, Landa i col. 2001). En canvi, els mètodes de prospecció que es realitzen directament amb material vegetal, comporten una gran inversió de temps i econòmicament són molt costosos, de manera que no són pràctics per realitzar la prospecció d'un gran nombre de soques.

Un altre dels mètodes de prospecció, que és una estratègia de compromís entre les dues anteriors, és el proposat per Andrews (1992) el qual es mostra a la figura 1.3, basat en la realització d'una primera prospecció dels possibles candidats en condicions d'ambient controlat tant *in vitro* com *in vivo* (no utilitzant plantes senceres sinó fulles, fruits immadurs, pecíols i llavors). Posteriorment, se seleccionen els candidats que han mostrat antagonisme en les dues condicions o bé solament en una de les dues, perquè no sempre es correlacionen els resultats d'antagonisme obtinguts *in vitro*

amb la capacitat de biocontrol *in vivo*.

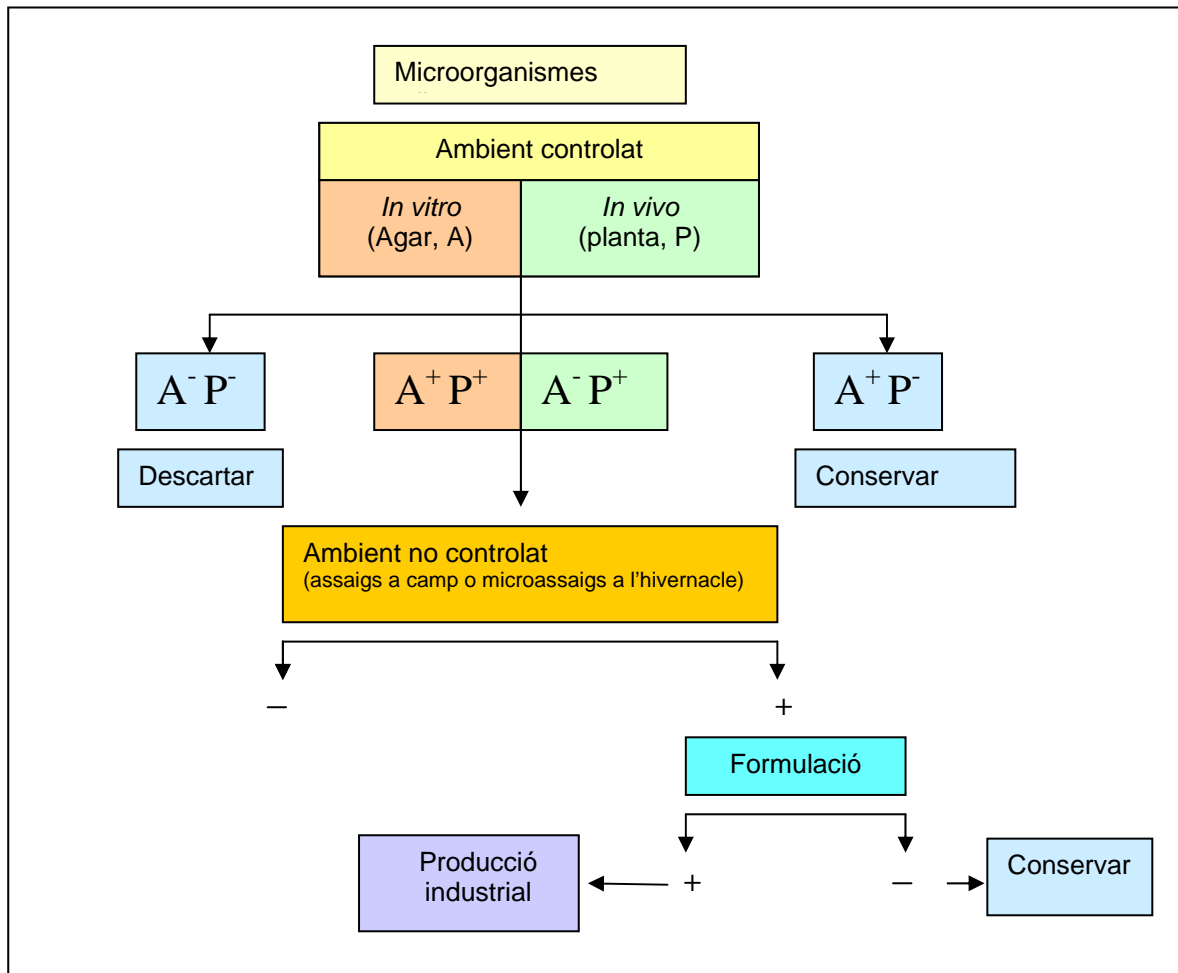


Figura 1.3 Organigrama de l'estratègia de prospecció d'agents de biocontrol. Font: Andrews (1992); +, activitat antagonista o supressió de la malaltia; -, manca d'activitat antagonista o supressió de la malaltia.

Figure 1.3 Proposed components and sequence of assays in a screening procedure for selecting biocontrol agents. From Andrews (1992). +, activity (antagonism or disease suppression); - no evidence of activity

D'aquesta manera es poden detectar els agents en els quals l'antagonisme es desenvolupa per mecanismes com la competència o producció de metabòlits antimicrobians. Aquests microorganismes escollits passen a una segona fase on els assaigs es porten a terme en el camp o es realitzen miniassaigs a l'hivernacle. Si el resultat és satisfactori s'estudia una formulació per a la producció a gran escala i comercialització i, en cas contrari, s'intenta una reformulació (Andrews 1985, 1992).

Actualment, però, hi ha autors que consideren que un dels factors més importants per a l'obtenció d'ACBs rau en l'estratègia de selecció. Aquesta selecció ha de començar cercant un patosistema, un mètode apropiat d'aïllament, de caracterització dels aïllats i d'avaluació de l'eficàcia. En aquesta estratègia se sol realitzar un enriquiment selectiu previ dels antagonistes en el patosistema seguit de l'aïllament dels bacteris dels extractes crus que mostren una bona eficàcia (Schisler i Slinger

1997, Vázquez 1998).

Per a la producció a gran escala i comercialització d'un agent de biocontrol, cal determinar el/s mecanisme/s que utilitza per inhibir el patògen i les condicions per afavorir i optimitzar al màxim la seva eficàcia. La formulació és necessària per assolir una presentació adequada del producte, així com per optimitzar la seva eficàcia, estabilitat, seguretat i ús. El fet de que els agents de biocontrol siguin microorganismes vius fa que a l'hora de la seva formulació es presentin un seguit de problemes tècnics en els quals nombrosos investigadors hi estan treballant (Cook 1993, Powell 1993, Okon i col. 1998, Moënné-Loccoz i col. 1999, Pengnoo i col. 2000). Una altra de les barreres per a l'ús comercial de soques productores d'antibiòtics inclou la pèrdua de producció de l'antibiòtic en determinades condicions en cultiu líquid, i els problemes en la formulació necessària a fi d'optimitzar el cost de la producció i l'aplicació del producte. En resum, la viabilitat, formulació i concentració dels agents de biocontrol, els tipus d'adjuvants utilitzats, l'estratègia i temps d'aplicació així com les condicions microclimàtiques durant i després de les aplicacions, i la seva adaptació a les metodologies agronòmiques, són paràmetres molt importants per poder aconseguir un bon control de les malalties (Sutton i Peng 1993, Jackson 1997, Boyetchko i col. 1999).

Un altre front en el que cal més investigació és sens dubte, l'estudi de noves estratègies per a l'ús de productes de biocontrol. Ja s'ha citat anteriorment que, fins ara, l'aplicació pràctica del biocontrol ha estat limitada a pocs productes comercials efectius front un baix nombre de patògens i en cultius molt concrets. Potser una estratègia per fer més exitós el biocontrol fóra, segons Alabouvette i Lemanceau (1999), reunir en un sol producte varis ACBs que presentessin diferents modus d'acció complementaris o sinèrgics enfront el mateix patògen o que actuïn contra diferents patògens d'un mateix cultiu. S'ha comprovat, per exemple, que l'efecte d'aplicar un grup d'ACBs era superior a l'efecte obtingut amb qualsevol de les soques independentment enfront a *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* (Fukui i col. 1999), *Fusarium* (de Boer i col.1999) i *Botrytis cinerea* (Guetsky i col. 2001). Aquesta nova estratègia, però, presenta més problemes a l'hora del desenvolupament comercial del producte així com per demostrar la innocuïtat en el procés de registre del producte. El mateix autor, ha proposat també una altra estratègia que rau en dotar de diferents modus d'acció a una sola soca, afegint caràcters absents per mitjà de l'enginyeria genètica, modificant la regulació de l'expressió de trets importants, o incrementant l'estabilitat de l'activitat.

Pel que fa referència als requeriments per al registre dels ACBs, que en el cas d'Europa estan descrits en la directiva de la Comunitat Econòmica Europea 91/414/CEE 1997, són menys severs en la demanda d'estudis i els procediments són menys costosos que en el cas dels productes químics. Tot i això, al 1999 no va registrar-se cap producte a la CEE, on els països no poden registrar-los independentment, mentre que se'n van registrar 10 als Estats Units (Neale i Newton, 1999).

1.1.3.3 Factors que afecten l'eficàcia dels processos de biocontrol

En el biocontrol s'estableixen un conjunt d'interaccions entre els factors biòtics com són l'ACB, el patògen i l'hoste, i els factors abiòtics com el clima i d'altres que són diferents depenent de si es tracta del sistema radical o part aèria de la planta. Aquests factors abiòtics proporcionen condicions ambientals molt variables entre patosistemes i en un mateix patosistema en diferents localitzacions incidint molt en l'eficàcia del biocontrol. Aquesta variabilitat en cada un dels sistemes de biocontrol a estudiar ha propiciat el fet de que s'hagi començat l'estudi en el sistema radical i fins i tot en el biocontrol de podridures en postcollita (Lima i col. 1999) abans que els estudis en la part aèria, on els factors físics com la disponibilitat d'aigua i de nutrients i l'exposició a la radiació ultraviolada són més variables en un període de temps curt. A la figura 1.4 es mostra un esquema representant les interaccions entre els diferents components que intervenen en els processos de biocontrol en la planta i a la taula 1.1 es resumeixen els factors que s'han de tenir en compte pel desenvolupament d'ACBs de malalties en el sistema radical segons Butt i col. (1999).

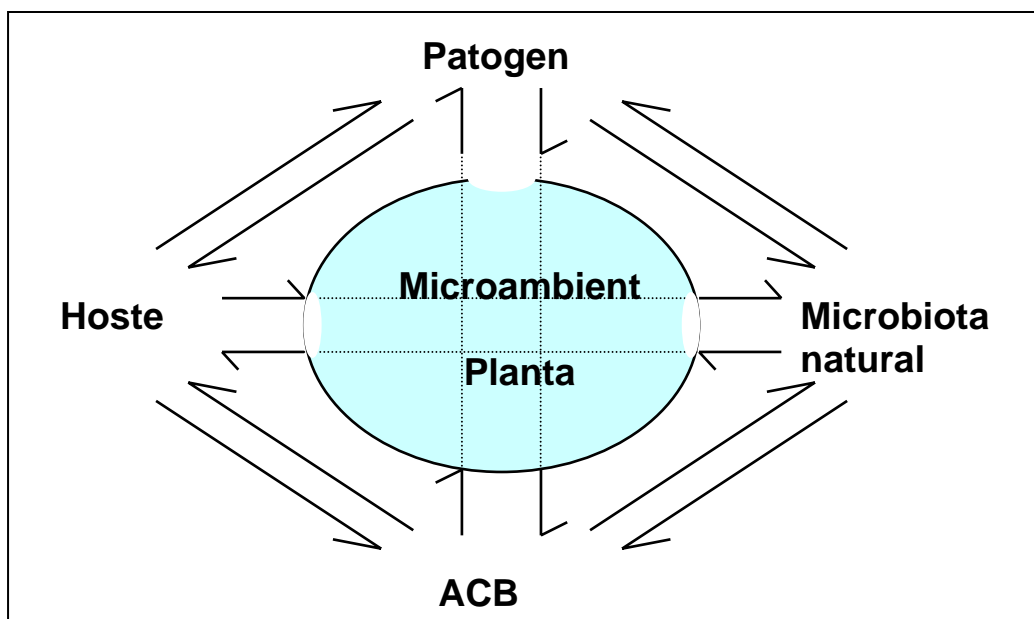


Figura 1.4 Interaccions entre els diferents components que intervenen en els processos de biocontrol en la planta. Font: Edwards i col. 1994.

Figure 1.4 Interactions involved in biocontrol systems of plant diseases. From Edwards *et al.* 1994.

Cal però, tenir en compte que els factors que es mostren a la taula 1.1, també s'interrelacionen entre ells i per exemple es pot veure la incidència que tenen els factors físics sobre els factors biòtics. Un dels requisits més importants per un bon agent de control biològic és la capacitat de colonització. Per tant, el manteniment d'una població suficientment elevada per ser efectiva, implicarà al mateix temps que tots els factors que incideixin d'una manera o altre en aquesta capacitat de colonització, establiment i manteniment de l'ACB siguin factors clau en el sistema de biocontrol.

En el cas del biocontrol en la rizosfera, un dels problemes que s'ha observat en alguns casos és la manca de biocontrol quan un ACB aïllat d'una determinada regió geogràfica s'aplica en una regió diferent, en altres tipus de sòls o en diferents condicions climàtiques. La naturalesa físico-química del sòl varia entre regions agrícoles pel que fa a la textura, el contingut de matèria orgànica i d'argiles, pH i disponibilitat d'oxigen i aigua. Aquestes diferències han estat postulades com a factors abiòtics molt importants (Défago i Haas 1990, Latour i col. 1996, Landa i col. 2001). S'ha vist per exemple que el control biològic de la malaltia del "Take-all" del blat s'assoleix després de 3 cultius continuats en sòls amb un pH de 5.5, però es retarda fins a 6 o 7 cultius quan el pH del sòl és superior a 7 (Duffy i col. 1997).

Taula 1.1 Factors que afecten l'èxit del ACBs en malalties de la part radical de les plantes. Font: Butt i col. 1999.

Table 1.1 Factors affecting the success of BCAs in soilborne plant diseases. From: Butt *et al.* 1999.

Supervivència a llarg termini	Rapidesa de l'efecte
<p>Físics</p> <ul style="list-style-type: none"> Tipus de sòl Potencial matriu Temperatura pH <p>Biòtics</p> <ul style="list-style-type: none"> Colonització Competició Hoste Estructures de resistència Resistència del patogen a l'ACB 	<p>ACB</p> <ul style="list-style-type: none"> Temps de recuperació Alliberament de la formulació Velocitat de creixement Mobilitat fins al lloc d'acció <p>Patogen</p> <ul style="list-style-type: none"> Taxa de creixement Capacitat de protecció del nínxol ecològic Producció de toxines

Pel que fa referència als factors biòtics, s'ha demostrat que en la colonització per part de l'ACB influeix la dinàmica de la població microbiana (Duffy i col. 1997, Troxler i col. 1997b, Latour i col. 1999, Ross i col. 2000). Si el mecanisme de biocontrol es basa en la competència per l'espai, la capacitat i la velocitat en que es dona aquesta colonització per part de l'ACB serà un punt clau per assolir una bona eficiència de biocontrol (Fukui i col. 1994, Natsch i col. 1996, Butt i col. 1999). S'ha demostrat també, amb la utilització de mutants, que la colonització per un determinat ACB capaç de produir metabòlits del grup de les fenazines és essencial per assolir el biocontrol (Chin-A-Woeng i col. 2000). Entre altres factors que afecten la colonització, el més important és sens dubte la influència de l'espècie vegetal hoste. En el cas de la rizosfera, les arrels alliberen compostos orgànics com a exsudats que són responsables de l'estimulació selectiva de la microbiota de les arrels (Lemanceau i col. 1995, Benizri i col. 1998, Smith i Goodman 1999, Molina i col. 2000, Notz i col. 2001).

Aquesta selecció que exerceix la planta hoste en la microbiota de les arrels també s'ha utilitzat en la selecció de microorganismes beneficiosos per un cultiu determinat. Per exemple s'està treballant en el cas de les malalties de replantació de la que afecta negativament al creixement i la producció de les noves pomeres (Utkhede i col. 1992). S'han identificat factors abiòtics i biòtics que són la causa del problema i s'han citat entre altres agents causals els fongs *Rhizoctonia* i *Pythium*. Mazzola i Gu (2000), van demostrar que després de tres cicles de cultiu de blat s'observava la selecció d'una població de *Pseudomonas* fluorescents que millorava el creixement dels arbres replantats i reduïa les infeccions de les arrels causades pels fongs.

En el cas de la filosfera s'han realitzat estudis sobre la microbiota epífita, tant en cambres d'ambient controlat com en el camp, i s'ha observat que la quantitat de bacteris epífits està influenciada per l'espècie de planta hoste, la diversitat microclimàtica que pot donar-se en els diferents llocs de la filosfera, l'edat de les fulles i sobretot, les condicions ambientals variables d'humitat relativa i temperatura (Hirano i Upper 1994, 2000, Kinkel i col. 2000).

Cal fer esment que en la realització dels primers assaigs amb soques bacterianes que són bones antagonistes enfront diversos patògens degut a la producció de metabòlits secundaris amb activitat antibiòtica, va posar-se de manifest que hi ha varis factors que influeixen en la producció dels metabòlits. Un ampli ventall de treballs han mostrat una gran variació per exemple en referència a la disponibilitat de nutrients ja en cultius de laboratori. Així, la glucosa va mostrar-se imprescindible per a la síntesi d'un dels tres antibiòtics produïts per *P. fluorescens* HV37a alhora que inhibia la producció dels altres dos (James i Gutterson 1986). Els sucres - a excepció de la glucosa - augmentaven la producció de 2,4-diacetilfloroglucinol per *P. fluorescens* F113, producció que estava influenciada per la temperatura, composició del medi i disponibilitat d'oxigen (Shanahan i col. 1992). La peptona també és imprescindible per a la síntesi de diferents productes antibiòtics en varies soques de *P. fluorescens* i *P. cepacia* (Rosales i col. 1995). Contràriament, la producció de bacteriocines per soques d'*Erwinia herbicola* està inhibida per la presència d'aminoàcids en el medi (Vanneste i col. 1992). Altres autors han mostrat que la producció conjunta de pioluteorina i PhI per *P. fluorescens* S272 és òptima en un medi que conté 2% d'etanol i que la producció de l'antibiòtic s'optimitza establint una relació C/N alta juntament amb una limitació de fosfat inorgànic en el medi (Yuan i col. 1998). En altres casos, la síntesi dels metabòlits depèn dels seus precursors i la disponibilitat d'aquests augmenta la producció, com el triptòfan en el cas de la pirrolnitrina (Leisinger i Margraff 1979) o la glicina en la síntesi de HCN (Wissing 1974). En últim cas, pot succeir, també, que en determinades condicions l'ACB no sintetitzi el metabòlit d'interès, ja que la producció d'aquests metabòlits depèn en gran mesura de les condicions físico-químiques que es donen en l'ambient en el qual s'introdueix i la interacció que s'estableix entre l'antagonista i la planta pot variar la seva capacitat d'induir els gens biosintètics (Kraus i Loper 1995, Notz i col. 2001). Malgrat ja es coneix aquesta limitació, la realització de treballs per demostrar-ho a camp és molt difícil i alguns autors consideren que els experiments al laboratori són una bona aproximació per a la identificació de possibles senyals ambientals que indueixin o reprimeixin la biosíntesi d'antibiòtics i sideròfors.

Majoritàriament s'han realitzat estudis emprant diferents fonts de carboni i minerals ja que se sap que aquests (i) influeixen en l'activitat del patogen, (ii) contribueixen a la variabilitat del biocontrol observada en diferents sòls i diferents cultius i, (iii) són factors clau en la síntesi d'antibiòtics. Per exemple, en *P. fluorescens* CHA0 s'ha determinat que la producció de pirrolnitrina s'incrementa amb fructosa, manitol i zenc, i la producció de Phl per glucosa i zenc (Duffy i Défago 1999). En l'actualitat la disponibilitat de nous protocols per a la quantificació de Phl ha fet possible l'estudi d'un alt nombre de soques productores en diferents medis per tal d'establir si les condicions d'incubació i el medi tenen un efecte general en la producció i conèixer quins factors són específics de la soca emprada (Alemany 2001). En alguns casos, s'ha demostrat que quan hi ha més d'un mecanisme implicat, les condicions ambientals poden influenciar la importància relativa de cada un dels mecanismes (Weller i col. 1988).

Més recentment, hi ha altres factors que s'han mostrat implicats en la interacció entre el patogen, l'antagonista i l'hoste per tal d'assolir un bon nivell de biocontrol, com per exemple les concentracions i la relació adequades de l'agent de biocontrol i del patogen. S'ha demostrat la influència de la concentració del patogen, l'ACB, l'eficàcia de l'ACB en la supressió del patogen i de la proporció del patogen que potencialment és afectada per l'ACB en el grau de supressió de la malaltia (Raaijmakers i col. 1995, Montesinos i Bonaterra 1996, Smith i col. 1997).

Altres factors que s'han descrit són les diferències de sensibilitat en el patogen (Mazzola i col. 1995) o la relació entre els metabòlits antimicrobians i la seva fitotoxicitat en l'hoste (Fujimoto i col. 1995). També algunes pràctiques culturals com la solarització poden influenciar l'assoliment del biocontrol. Gamliel i Katan (1993) van mostrar que la qualitat i composició dels exsudats de les arrels en sòls solaritzats/no solaritzats són diferents i, per tant, poden afectar la competició entre la microbiota del sòl. També s'ha posat de manifest l'efecte de la selecció de la microbiota bacteriana en un mateix sòl com a conseqüència del cultiu continuat d'una espècie vegetal, enfront d'una rotació de cultius (Shiomi i col. 1999, Achouak i col. 2000a).

Per alguns autors, un altre aspecte a tenir en compte a l'utilitzar un ACB en el sòl és l'establiment de les relacions entre aquest i altres microorganismes presents (Natsch i col. 1997, 1998, Girlanda i col. 2001, Glandorf i col. 2001, Moënné-Lozoc i col. 2001, Thiurp i col. 2001), sobre tot, els que són beneficiosos per les plantes com ara les micorrizes amb especial interès en les interaccions antagoniques i sinèrgiques entre les micorrizes i els ACBs (Calvet i col. 1992, Frey i col. 1997, Bianciotto i col. 2001).

1.1.3.4 Seguiment i traçabilitat dels agents de biocontrol

Un aspecte interessant en l'ús dels ACBs rau en la necessitat de disposar de tècniques prou específiques i discriminatòries amb la fi de realitzar el seguiment per estudiar el seu comportament quant a la colonització, ecologia i impacte ambiental, prèviament a la utilització comercial com a

agents de biocontrol.

El nombre de mètodes disponibles per a assolir aquest objectiu s'ha incrementat notablement en els darrers anys gràcies a l'aplicació de la tecnologia del DNA recombinant. Aquests nous mètodes ofereixen més especificitat i faciliten la detecció del microorganisme en comparació amb els mètodes tradicionals com la contraselecció de marcadors de resistència a antibiòtics o mètodes immunològics (Prosser 1994, Ryder 1995, Plimmer 1999). Paral·lelament a l'ús d'aquestes tècniques, han sorgit noves possibilitats d'estudi com són el nivell d'activitat metabòlica específica, detecció de microorganismes viables però no cultivables (Troxler i col. 1997a, 1997b, 1997c, Bloomfield i col. 1998, Normander i col. 1999, Mascher i col. 2000), així com l'expressió dels gens implicats en el biocontrol (Lee i Cooksey 2000).

Inicialment es va utilitzar com a marcador fenotípic la resistència a antibiòtics codificada en plasmidis, però actualment es prefereix l'ús de marcadors cromosòmics per la possibilitat de transferència horitzontal dels plasmidis a altres bacteris afins, a més d'observar-se la pèrdua de la resistència en absència de selecció i/o sota condicions desfavorables (Griffiths i col. 1990). A la taula 1.2 es resumeixen els principals mètodes de detecció que s'utilitzen actualment. Quant a l'ús del marcatge de soques mitjançant l'obtenció de mutants espontanis de resistència a antibiòtics, en ser una metodologia relativament sensible, ràpida i econòmica, va ser la primera i més àmpliament utilitzada. El desavantatge més important rau en que pot haver-hi un elevat "soroll de fons", degut a una alta freqüència de mutació en condicions naturals dependent del sistema on s'apliqui. En el cas de la presència de la resistència amb una freqüència elevada en la població natural es poden realitzar seleccions amb més d'un antibiòtic alhora però aquests mutants dobles moltes vegades presenten alteracions no desitjables respecte de la soca salvatge.

Els primers treballs amb soques del gènere *Pseudomonas* van tenir com a objectiu la comprovació de l'estabilitat de la resistència a la rifampicina com a marcador. Ja en la dècada dels 80 es va començar a utilitzar aquest sistema per a estudis de supervivència de *P. fluorescens* en sòls (Duppler i Baker 1984). Amb *P. putida* WCS358 (soca d'interès pel seu ús com a BPCP) els resultats van mostrar que la resistència a la rifampicina era un marcador estable en condicions de camp (Glandford i col. 1992). Resultats idèntics han estat descrits en estudis de competència dels mutants respecte de la soca salvatge en *P. fluorescens* NBRT9926 (Nautiyal 1997). Cal tenir en compte que altres treballs, com els realitzats amb *P. fluorescens* PF1-8, han mostrat que alguns mutants de la soca sobreviuen en el sòl tan bé com la soca salvatge però d'altres no assoleixen el mateix comportament (Compeau i col. 1988).

S'han dut a terme estudis amb el marcatge de resistència a la rifampicina de soques de *P. fluorescens* actives en el biocontrol com és el cas de *P. fluorescens* CHA0 per esbrinar la influència de la introducció d'aquesta mutació en la diversitat de *Pseudomonas* indígenes (Natsch i col. 1997), per a l'estudi de la supervivència de *P. fluorescens* EPS288 en fulles (Montesinos i col.

1996a) i de *P. fluorescens* 2-79 en la rizoplana (Dandurand i col. 1997), entre altres.

Taula 1.2 Mètodes, requeriments i alguns exemples de les tècniques disponibles per al seguiment i traçabilitat de bacteris. Font: modificat de Ryder, M.H. 1995.

Table 1.2 Methods, requirements and some examples of currently available techniques for monitoring of bacteria. Modified from Ryder, M.H. 1995.

Mètode	Requeriments	Exemples
Contraselecció de resistència a antibiòtics en medis de cultiu selectius	<ul style="list-style-type: none"> - cultivabilitat - absència de soroll de fons - que la mutació no afecti al creixement, funcions i capacitats de la soca 	rifampicina, àcid nalidíxic
Introducció de marcadors gènics	<p>manipulació genètica per introduir:</p> <ul style="list-style-type: none"> -noves capacitats metabòliques -resistència a metalls pesants - bioluminiscència - transposons portadors de resistència a antibiòtics 	<ul style="list-style-type: none"> utilització de la lactosa mercuri, arsenit operó Lux Tn5
Hibridació d'àcids nucleics amb sondes de DNA	<ul style="list-style-type: none"> -identificació de la seqüència diana o bé introducció per manipulació genètica. 	hibridació de colònies o detecció directa
Mètodes Immunològics	<ul style="list-style-type: none"> - ús d'anticossos poli i/o monoclonals 	tècniques ELISA i IF

Quant a l'ús d'altres marcadors, *P. fluorescens* SBW25, que pertany al complex de les *Pseudomonas* fluorescentes, no patògenes i no actives en biocontrol, ha estat molt utilitzada en estudis d'autoecologia (establiment i competència) de microorganismes modificats genèticament (GMM) (Thompson i col. 1995, Naseby i col. 1999), en estudis d'adquisició de plasmidis en condicions naturals entre membres de *Pseudomonas* i en treballs sobre l'efecte de la possessió del plasmidi en la seva ecologia (Lilley i col. 1994, Lilley i Bailey 1997a, 1997b). Així, per exemple, en *P. fluorescens* SBW25 (*lacZY*, *Kanr*, *xyl E*) s'han inserit en el cromosoma els gens *aph* (resistència a la Kanamicina), *xyl E* (activitat catecol 2,3-deoxygenasa) i *lacZY* (activitat β -galactosidasa) i en *P. fluorescens* SBW25ETc s'ha introduït el gen de resistència a la tetraciclina. La tria del marcador a inserir ha d'estar lligada al tipus d'experiment que es vol dur a terme. Així, per a l'estudi de la influència de la temperatura, nutrients o efecte de la seva concentració en la inducció a l'estat de cèl·lules viables però no cultivables s'han introduït els gens *lux* (Oliver i col. 1995). En aquest treball els marcadors van introduir-se mitjançant plasmidis integrats al cromosoma i en plasmidis lliures, observant-se que el plasmidis poden tenir efectes dramàtics en la cultivabilitat. En altres estudis s'ha utilitzat *P. aureofaciens* 3732 RN-L11 (*LacZY*) per investigar la plasticitat fenotípica d'aquesta soca durant un període de dos anys després de ser inoculada a camp (Germida i col. 1998)

Actualment tots els gens introduïts per disposar de marcadors han estat a nivell cromosòmic donat que s'ha demostrat que el fet de posseir un plasmidi es reflecteix en una reducció de la taxa de creixement i, en conseqüència en un augment del temps de generació, que és un inconvenient per al portador en absència de selecció positiva. Un altre inconvenient és la disminució de la competitivitat respecte els no portadors de plasmidis, exceptuant el cas de que els plasmidis continguin informació que els doni avantatges (per exemple, augmenti les seves capacitats metabòliques de degradació d'algun compost present en el lloc introduït). Cal tenir també en compte l'existència de major risc de transferència horitzontal *in vivo* i *in situ* en marcadors situats en plasmidis (Lilley i col. 1994, Lilley i Bailey 1997a).

Tot i que és preferible el marcatge en el cromosoma envers la utilització de plasmidis, estudis recents també han evidenciat que gens cromosòmics de *Pseudomonas* spp. es poden transmetre per conjugació i transformació a altres bacteris habitants de la rizosfera, inclusivament sota condicions no estèrils, però amb menor freqüència (Troxler i col. 1997a).

Paral·lelament a l'ús d'aquests marcadors més coneguts, s'han desenvolupat nous mètodes molt sensibles per poder detectar i observar cèl·lules individuals amb proteïnes verdes fluorescentes (Green fluorescent proteins, GFP) de la medusa *Aequorea victoria*. Aquests nous marcadors es mostren molt útils tant en models de laboratori com en ambients naturals d'interès com els biofilms i les arrels de les plantes. El principal avantatge d'aquest nou marcador rau en que les cèl·lules poden ser estudiades sense necessitat de destruir-les ni l'addició de substrats exògens i que, a més, poden visualitzar-se mitjançant microscòpia de fluorescència. El marcador GFP introduït en plasmidis s'ha utilitzat per a la detecció i observació de cèl·lules de *P. fluorescens* WCS365 en el sòl (Bloemberg i col. 1997, 2000), en altres rizobacteris per a l'estudi de les interaccions bacteri-planta (Stuurman i col. 2000) i ja inserit en el cromosoma, per estudiar la localització, viabilitat i activitat cel·lular de *P. fluorescens* DR54-BN14 en l'arrel (Normander col. 1999), la colonització de les llavors per *P. chlororaphis* MA342 (Tombolini i col. 1999) i la descripció de l'estructura de biofilms on intervenen diferents grups de *Pseudomonas* (Heydorn i col. 2000).

Una altra alternativa en el seguiment i detecció dels ACBs consisteix en la utilització de més d'un mètode alhora, per exemple mitjançant un marcat gènic híbrid, per tal de monitoritzar el bacteri emprant mètodes immunològics amb la detecció d'una proteïna de membrana, i a nivell de DNA, inserint una seqüència coneguda que es pot amplificar amb la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Zaat i col. 1994). En altres casos s'han emprat tècniques immunològiques juntament amb observació amb microscopi de rastreig amb làser comfocal per determinar la localització de *P. fluorescens* a les arrels (Hansen i col. 1997, Lübeck i col. 2000).

La diversitat de mètodes per al seguiment dels agents de biocontrol sense manipulacions genètiques és més limitada, però àdhuc amb els ACBs poden emprar-se mètodes alternatius a la resistència a antibiòtics o juntament amb aquesta, com per exemple mètodes immunològics

(Compeau i col. 1988) o mètodes alternatius basats en marcadors genòmics naturals. Els marcadors genòmics naturals van encaminats més a la comprovació de la identitat d'aïllats inoculats i posteriorment recuperats per contraselecció per la resistència a antibiòtics en medis selectius, que no a la identificació de totes les colònies que poden recuperar-se. L'ús de marcadors genòmics naturals s'empra en estudis que es porten a terme actualment per identificar i realitzar un seguiment dels ACBs. Entre els mètodes que permeten cercar marcadors genòmics, podem citar els que utilitzen la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) o els independents de la PCR que han començat a utilitzar-se a rel del gran avenç en la caracterització genòmica en bacteris.

Els mètodes que empen la tècnica de la PCR poden classificar-se, al mateix temps, en els que realitzen "empremtes de DNA" i en els que amplifiquen fragments prèviament caracteritzats. En el primer cas, s'utilitzen els patrons generats en l'amplificació múltiple arbitrària (RAP) quan han mostrat ser característics i únics per a una determinada soca tant de bacteris (Möenne-Loccoz i col. 1996, Fedi i col. 1997) com de llevats (Leibinger i col. 1997, Schena i col. 2000). Quant a la utilització de l'amplificació d'un fragment prèviament caracteritzat (sequence characterized amplified region, SCAR); es procedeix primer a la realització d'un RAP, seguit de la identificació d'un fragment específic; un cop escollit el fragment específic cal dissenyar uns encebadors d'aquesta seqüència i emprar-los en una amplificació per PCR d'aquest fragment característic (Zijlstra 2000).

Un mètode independent de la PCR que també s'utilitza és el polimorfisme en la longitud dels fragments de macrorestricció genòmica (MRFLPs) obtinguts mitjançant l'ús d'enzims de restricció de tall poc freqüent i separats amb la tècnica de l'electroforesi en camp polsant (PFGE) (Cirvilleri i col. 1996).

1.2 El gènere *Pseudomonas* com a font d'agents de biocontrol

Fa més de 100 anys que va ser definit el gènere *Pseudomonas* per Migula al 1894. Des de llavors la família *Pseudomonadaceae* és una de les famílies que ha sofert més canvis taxonòmics al llarg del temps. Els membres d'aquesta família es troben abundantment com a sapròfits del sòl, aigua, ambients marins i en molts altres materials naturals, així com en estreta associació amb plantes i animals.

1.2.1 El gènere *Pseudomonas* i l'espècie *P. fluorescens*

La primera definició del gènere *Pseudomonas* per Migula al 1894 tenia en compte principalment les propietats morfològiques. Estudis posteriors d'atributs fisiològics van permetre separar-los d'altres bacteris similars (Stanier i col. 1966). Però aquestes primeres classificacions del gènere eren confuses i això va ocasionar que espècies bacterianes poc caracteritzades s'assignessin al gènere, mantenint-se amb una estabilitat molt precària i disgregant-se al llarg d'aquests 100 anys en funció dels nous coneixements que s'anaven acumulant.

En el transcurs dels anys, el gènere *Pseudomonas* ha estat objecte de repetides revisions taxonòmiques (Palleroni i Doudoroff 1972, Palleroni 1984, 1986, 1992, 1993, Kersters i col. 1996). Cap a la dècada dels 60 van començar a portar-se a terme estudis de similitud amb el DNA i si bé es mantenien els grups basats en les dades fenotípiques, els nous estudis van mostrar que algunes espècies eren molt heterogènies respecte a l'homologia DNA-DNA. Els nivells de similitud entre membres de diferents grups fenotípics es movien en uns límits molt amplis. Per solucionar aquesta situació Palleroni i col. (1973) van ampliar els estudis d'homologia al RNA ribosomal (rRNA). Com sembla que les seqüències de DNA que codifiquen per rRNA han sofert menys canvis que la majoria de DNA en el transcurs de l'evolució, es va creure que seria un bon marcador de la distància entre espècies del gènere *Pseudomonas*. Els resultats van mostrar més similituds rRNA-DNA que les obtingudes amb DNA-DNA. En relació a aquestes homologies es van definir 5 grups principals. L'homogeneïtat trobada dins cada grup rRNA era molt superior a la reflectida amb el DNA, mostrant-se en cada grup rRNA que moltes espècies tenien quasi un 100% de similitud però que els grups eren tan diferents entre ells com cada un d'ells respecte *Escherichia coli*.

Tot i aquesta classificació, l'alt grau d'heterogeneïtat dins el gènere es reflecteix amb la presència d'espècies que mostren una relació molt llunyana i que han estat reclassificades en altres gèneres existents o gèneres definits de nou. Espècies de *Pseudomonas* que abans pertanyien als grups II, III, IV i V rRNA, s'han reclassificat en gèneres com *Breondimonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Aminobacter*, *Comamonas*, *Acidovorax*, *Hydrogenophaga*, *Telluria* i *Stenotrophomonas* (Yabuuchi i col. 1992, 1995, Palleroni 1993, Holloway 1996, Kersters i col. 1996) com es pot observar a la figura 1.5. En el cas de bacteris fitopatògens pertanyents als gèneres *Pseudomonas* i *Xanthomonas* també s'han produït des del 1980 algunes revisions en el sentit de proposar reclassificacions i/o creació de noves espècies (Bennasar i col. 1996, Achouak i col. 2000b, Schaad i col. 2000, Young i col. 2001). Aquestes reclassificacions han tingut lloc en certs casos en varies etapes com en el cas de *P. malthophilia*; aquesta espècie es va transferir primer del gènere *Pseudomonas* al gènere *Xanthomonas* (Swings i col. 1983) deixant sense validesa dues de les característiques més adequades per a la identificació de *Xanthomonas* com són la patogenicitat i la producció dels pigments del grup de les xantomonadines que eren absents en la nova espècie inclosa. Deu anys més tard, es va reassignar *P. malthophilia* al gènere *Stenotrophomonas* (Palleroni i Bradbury 1993).

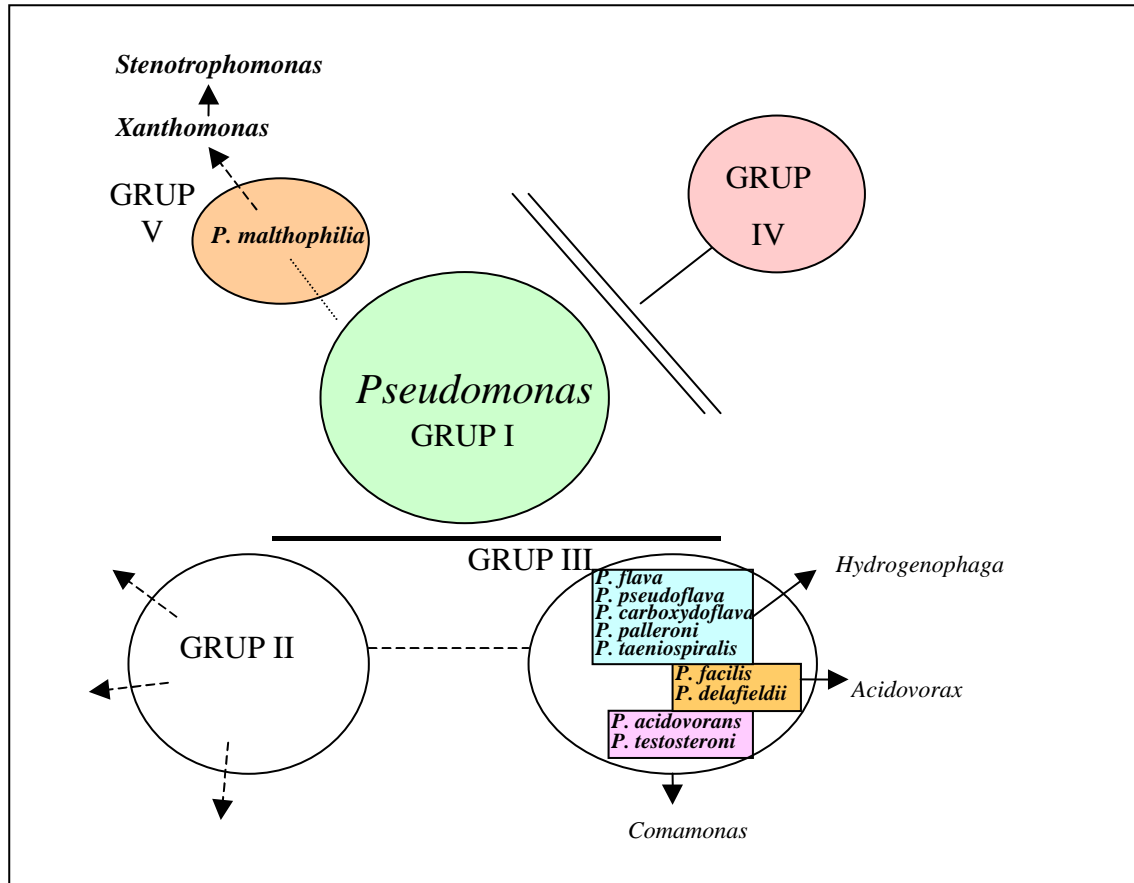


Figura 1.5 Esquema simplificat de l'estat actual de la taxonomia de *Pseudomonas*. El grup I correspon al grup que conserva el nom del gènere, anomenat *Pseudomonas* (sensu stricto). Les fletxes indiquen les assignacions d'espècies de l'antic gènere a altres gèneres. Font: Palleroni, 1992.

Figure 1.5 Simplified scheme of the present state of *Pseudomonas* taxonomy. Group I corresponds to *Pseudomonas* (sensu stricto), which is, the group that will retain the genus name. Assignments of members of other groups to different genera are indicated. From: Palleroni 1992.

Les reclassificacions que s'han portat a terme queden reflectides també en el canvi d'espècies dins del gènere, que en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Doudoroff i Palleroni 1974) presentava 29 espècies ben caracteritzades i 235 que no ho estaven tant, per posteriorment passar a 112 espècies reconegudes en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Palleroni 1984).

En l'última dècada, el coneixement de les relacions filogenètiques juntament amb estudis taxonòmics polifàsics han propiciat revisions de les espècies de *Pseudomonas*. El conjunt d'anàlisis i rearranjaments taxonòmics ha ocasionat que el grup I rRNA que inclou l'espècie tipus *Pseudomonas aeruginosa* i altres espècies com *P. fluorescens*, *P. putida*, i *P. syringae* es consideressin membres d'un grup filogenèticament homogeni. En conseqüència, a aquest grup d'espècies se les ha anomenat com a *Pseudomonas* (sensu stricto) (Palleroni 1992, Kersters i col. 1996, Moore i col. 1996).

D'entre les aproximacions que s'han realitzat en els nombrosos estudis taxonòmics de *Pseudomonas* podem citar hibridacions DNA-RNA (Palleroni i col. 1973, Johnson i Palleroni 1989), perfils de proteïnes (De Vos i col. 1993, Vancanneyt i col. 1996a), perfils d'àcids grassos (Janse i col. 1992; Vancanneyt i col. 1996b), utilització de fonts de carboni (Klingler i col. 1992, Grimont i col. 1996), creixement en medis no selectius diferencials (King i col. 1954), creixement en medis selectius (Simon i Ridge 1974, Burr i Katz 1982; Gould i col. 1985), creixement en medis semiselectius (Achouak i col. 2000a), reacció amb anticossos específics (Kragelund i col. 1996), amplificació del 16S rDNA seguit d'ARDRA (Laguerre i col. 1994), amplificació del 16S rDNA amb un protocol altament selectiu per al gènere *Pseudomonas* (sensu stricto) en mostres ambientals (Widmer i col. 1998), seqüenciació de 16S rDNA (Moore i col. 1996, Tesar i col. 1996, Van de Peer i col. 1996, Anzai i col. 1997), patrons de macrorestricció genòmica amb la utilització d'enzims de restricció de tall poc freqüent separats per electroforesi de camp polsant (PFGE) (Grothues i Tümmler 1991), i estudis basats en hibridació DNA-DNA de fragments genòmics (Cho i Tiedje 2001)

La taxonomia molecular basada en les seqüències del 16S rDNA situa el gènere *Pseudomonas* juntament amb els subgrups d'*Acinetobacter* i *Teredinibacter*, i en les branques adjacents els grups *Oceanospirillum* i el conjunt *Colwellia* (Widmer i col. 1998). Tot i l'esforç esmerçat, la taxonomia molecular no ha quedat molt clarificada i encara que aquestes tècniques han estat molt emprades, en general s'han observat un seguit de factors que afecten la reconstrucció filogenètica molecular que modifiquen la validesa que s'atorgava fins ara a aquesta aproximació (Moreira i Philip 2000).

Recentment, s'ha mostrat interès en l'estudi de les poblacions bacterianes començant per *Escherichia coli* i altres patògens humans i s'ha destacat l'estructura clonal d'algunes espècies en les que les recombinacions involucren canvis importants en regions cromosòmiques que semblen poc comuns. S'ha observat també la presència d'estructures de mosaic en els gens que impliquen intercanvis de fragments petits per transducció i transformació entre espècies relacionades que comparteixen una dotació genètica comú mitjançant la transferència horitzontal. Hi ha poques referències en *Pseudomonas*, però l'estructura podria no ser clonal en haver-hi recombinacions cromosòmiques freqüents, suficients per al desenvolupament i persistència a llarg termini de complexes o espècies relacionades. Malgrat tot, les dades obtingudes fins ara són insuficients per a una afirmació; contràriament, si que sembla que el gènere *Xanthomonas* sigui essencialment clonal (Palleroni i col. 1992).

Segons el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Palleroni 1984), el gènere *Pseudomonas* està format per bacils Gram negatius rectes o corbats, mòbils per un o més flagels polars que generalment mesuren 0.5-1.0 µm de diàmetre per 1.5-5.0 µm de longitud, aeròbics amb metabolisme respiratori que utilitza l'oxigen com a acceptor terminal d'electrons tot i que en alguns casos el nitrat pot ser emprat com a acceptor d'electrons alternatiu permetent que el creixement

tingui lloc en anaerobiosi. La majoria de les espècies que formen part d'aquest gènere poden créixer en un rang de temperatures molt extens (dels 4 als 43 °C) si bé no poden desenvolupar-se en condicions àcides (pH 4.5). Són catalasa positius i oxidasa positius o negatius. El contingut de % G+C en el DNA oscil·la del 58 al 70.

Aquest gènere, on es troben descrites més de 100 espècies, està considerat com un dels grups de bacteris Gram negatius més complex i alhora interessant per presentar una gran versatilitat metabòlica molt útil en biotecnologia i bioremediació. Podem citar el seu interès pel que fa referència a l'elevada capacitat de degradació de compostos orgànics (incloent compostos aromàtics, derivats halogenats i residus orgànics recalcitrants) (Heinaru i col. 2000), com a rizobacteris promotors del creixement en plantes (BPCP) (Kloepper 1992) i com a agents de biocontrol (ACBs) (Défago i Hass 1990, Thomashow i Weller 1996). D'altra banda, el grup de les *Pseudomonas* també compte amb patògens de plantes, i altres associats a infeccions en animals i humans, a més de tenir representants en el grup de microorganismes que intervenen en processos de descomposició de productes alimentaris (Bergan 1986, Schroth i col. 1986, Stolp i Gadkart 1986, Wiedmann i col. 2000).

Tot i que la majoria de *Pseudomonas* no són patògens d'animals, varies espècies d'aquest grup estan associades a infeccions oportunistes en animals i humans. Per exemple, *P. cepacia* (reclassificada com a *Burkholderia cepacia*) ha estat aïllat de teixits humans infectats. Com que els membres d'aquesta espècie són tan difícils d'identificar fenotípicament, se suposa que freqüentment s'han assignat incorrectament a altres gèneres. *P. aeruginosa*, conegut com a agent infecció transmès per aigua i aliments (Morais i col. 1997), és un patògen oportunista que afecta principalment a malalts immunodeprimits i a pacients amb fibrosi quística. Per aquesta raó, en alguns països la legislació demana la garantia de que l'aigua i els productes d'aigua embotellada estiguin lliures de *P. aeruginosa* (Morais i col. 1997); a més, recentment s'ha demostrat que també poden infectar plantes (Rahme i col. 1997).

Una altra característica que cal destacar del gènere és la seva elevada capacitat per tolerar molts productes químics tòxics degut a la presència d'enzims que poden degradar-los, els gens dels quals es troben freqüentment codificats en plasmidis (els anomenats factors de resistència a antibiòtics, metalls pesants i una gran varietat d'agents tòxics físics i químics). Aquestes propietats han esdevingut més comuns per l'extensiu ús d'antibiòtics en medicina i veterinària (Palleroni 1993). Aquests plasmidis que són principalment catabòlics i codifiquen per enzims involucrats en la degradació o resistència a compostos tòxics, són transferibles a altres bacteris Gram negatius per conjugació i s'està observant una elevada diversitat molecular entre ells (Sentchillo i col. 2000).

Cal destacar que una altra característica important d'un grup d'espècies dins del gènere *Pseudomonas* és la producció d'uns compostos de baix pes molecular en condicions de baixa disponibilitat de ferro anomenats sideròfors. Aquests compostos són quelants i transporten el Fe^{3+}

cap a l'interior de la cèl·lula gràcies a receptors de membrana i sistemes de transport específics que reconeixen el complex ferro-sideròfor (Loper i Buyer 1991). Els bacteris fluorescents del gènere *Pseudomonas* produeixen sideròfors del tipus pioverdines i/o pseudobactines, pigments groc-verds que emeten fluorescència sota la il·luminació amb llum ultraviolada. L'àcid salicílic, una molècula implicada en processos de biocontrol, s'ha demostrat que és també un sideròfor en alguna soca de *P. fluorescens* (Meyer i col. 1992).

L'espècie *Pseudomonas fluorescens*

L'espècie *P. fluorescens* és molt heterogènia pel que fa a propietats fenotípiques i probablement és una de les més complexes dins el gènere (Palleroni 1992, Kersters i col. 1996, Moore i col. 1996). L'espècie s'ha dividit en grups o subespècies d'acord amb un conjunt de característiques fenotípiques. Malgrat l'esforç i la laboriosa feina que s'ha realitzat, cap de les classificacions que s'han proposat dins de l'espècie semblen satisfactòries per l'elevada presència de soques que presenten formes intermèdies entre les descrites.

Al 1966, Stanier i col. van dividir l'espècie en 7 biovars (del A al G). Al 1984 Palleroni va separar dos dels biovars en les espècies *P. chlororaphis* (anteriorment biovar D) i *P. aureofaciens* (anteriorment biovar E) quedant solament 5 biovars que van nomenar-se com a biovar I al V. Nous estudis de Barret i col. (1986) amb més soques van provocar l'escissió de part dels aïllats considerats del biovar V en el nou biovar VI. L'últim canvi acceptat en la classificació ha estat la unió de les espècies *P. chlororaphis* i *P. aureofaciens* amb el nom de *P. chlororaphis* per Johnson i Palleroni (1989), ja que els valors de similitud d'homologia DNA-DNA observats eren molt elevats i no es va creure convenient mantenir les dues espècies per separat. Aquests canvis recents en els biovars descrites en *P. fluorescens* es reflecteixen a la taula 1.3.

Taula 1.3. Classificació dels biovars descrites en *Pseudomonas fluorescens* per diversos autors.
Table 1.3. Biovar classification of *P. fluorescens* according different authors.

Autors	Biovars descrites (*)						
	A	B	C	D	E	F	G
Stanier i col. 1966	A	B	C	D	E	F	G
Palleroni 1984	I	II	III	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. aureofaciens</i>	IV	V
Barret i col. 1986	I	II	III	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. aureofaciens</i>	IV	V VI
Johnson i Palleroni, 1989	I	II	III	<i>P. chlororaphis</i>		IV	V VI

(*) quan el biovar ha passat a ser una nova espècie, s'especifica quina és l'espècie.

(*) if the biovar is a new species, the name of the species is provided.

Hi ha també certs problemes pel que fa referència a espècies que són fenotípicament quasi indistingibles d'algun dels biovars descrits; aquest és el cas de *P. marginalis*. Aquesta espècie causant de podridures toves de l'arrel és, en les anàlisis dels perfils d'àcids grassos i de proteïnes, idèntica a *P. fluorescens* biovar II (Janse i col. 1992, Vancanneyt 1996b). Per aquest motiu, es creu que no és justificable el fet de crear una espècie que s'hauria de considerar artificial. Amb les anàlisis de perfils de proteïnes tampoc es poden diferenciar *P. chlororaphis* de *P. fluorescens* ni de *P. toolassi* (Janse i col. 1992, Vancanneyt i col. 1996a).

Dels biovars descrits, potser el biovar V, és el més heterogeni de tots, i s'ha emprat en molts casos com a reservori de soques no biotipables. Molts autors estan a favor de la idea de que les soques d'aquest biovar poden provenir de la resta de biovars quan han perdut algunes de les propietats característiques.

D'altra banda, els nivells de reassociació DNA-DNA entre el biovar I i els biovars III i V es situen entre el 30 i 48% respectivament (Brosch i col. 1996), de manera que es podrien considerar també espècies diferents.

En el Capítol 3 d'aquesta Tesi Doctoral es mostren taules de les proves fisiològiques i bioquímiques més importants emprades per a la identificació i classificació de *P. fluorescens* segons Palleroni (1984) i Digat i Gardan (1987). En els darrers temps, però, s'ha trobat que en augmentar el nombre d'aïllats en els estudis, moltes soques presenten alguna o més característiques diferents dels biovars on s'assignarien, mentre que altres aïllats no es poden assignar a cap biovar (Janse i col. 1992) i, a més, alguns autors han descrit formes intermèdies també entre *P. fluorescens*-*P. putida* (Digat i Gardan 1987).

Els nombrosos estudis que s'han realitzat, apart dels portats a terme amb les proves fisiològiques i bioquímiques més convencionals, donen també resultats molt poc concloents per a la separació de *P. fluorescens* en biovars i inclusivament per separar els antics biovars d'Stanier i col. al 1966 i que són classificats ara com a *P. chlororaphis* (Palleroni 1984, Johnson i Palleroni 1989).

1.2.2 Estat actual del biocontrol de malalties amb bacteris del gènere *Pseudomonas*

Els bacteris del gènere *Pseudomonas* s'han estudiat des de fa molt temps com a agents de biocontrol per dues raons principals: la seva capacitat de sintetitzar productes antimicrobians i la gran diversitat d'hàbitats que colonitzen habitualment (Leong 1986, Gutterson 1990, O'Sullivan i O'Gara 1992, Budzikiewicz 1993). El resultat i importància del treball que s'ha portat a terme en la recerca d'ACBs dins el gènere *Pseudomonas* queda palès a la taula 1.4 on es descriuen breument els productes d'origen biològic registrats comercialment a diferents països que contenen com a

agent de biocontrol espècies del gènere *Pseudomonas*. En comparació amb els productes registrats el 1998, cal destacar la incorporació dels productes Spot-less, Cedomon i Deny, i la retirada del mercat de Pssol i Victus que tenien com a agent de biocontrol una soca de *P. solanacearum* no patògena i *P. fluorescens* NCBI12098, respectivament. Malgrat la disponibilitat d'alguns productes comercials, les vendes d'agents de biocontrol han estat l'any 1999 menors de l'1% del mercat de fungicides venuts a Europa (Butt i col. 1999).

Taula 1.4. Productes comercials registrats per a la seva comercialització on l'agent de biocontrol pertany al gènere *Pseudomonas*. Font: Fravel 2001.

Table 1.4. Commercial registered products where the biocontrol microorganism is *Pseudomonas*. From: Fravel 2001.

Producte	Agent de biocontrol	Patogen diana	Cultiu
Biosave-100 Biosave-110	<i>P. syringae</i> ESC-10 <i>P. syringae</i> ESC-11	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp. <i>Mucor pyroformis</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	llimoner, pomelo (postcollita)
BlightBan A506	<i>P. fluorescens</i> A506	<i>Erwinia amylovora</i>	ametller, pomera, cirerer, perera, presseguer, patatera, maduixera, tomatera.
Conquer	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	bolets
Intercept	<i>P. cepacia</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i>	blat de moro, cotó, horticòles
Spot-less	<i>P. aureofaciens</i> Tx-1	<i>Phytium aphanadermatium</i>	gespa
Cedomon	<i>P. chlororaphis</i>	<i>Fusarium</i> sp.	cereals
Deny	<i>P. cepacia</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Phytium</i> ; <i>Fusarium</i>	cereals, vegetals

Un nombre molt elevat dels ACBs més efectius en la supressió de malalties pertanyen a les espècies *P. fluorescens*, *P. putida* i *P. cepacia*, sent possiblement un dels grups de bacteris productors d'antibiòtics més estudiats. A les taules 1.5 i 1.6 es resumeixen uns quants exemples de biocontrol en postcollita i en producció de fruita per diferents espècies de *Pseudomonas*, indicant-se el patògen afectat i el possible mecanisme d'acció.

Taula 1.5 Control de malalties causades per fongs fitopatògens mitjançant soques de *Pseudomonas* en postcollita de fruita i possibles mecanismes d'acció. Font: Wilson i Wisniewski 1989, Francés i col. 1997, Francés 2000, Chalutz i Droby 1998.

Table 1.5 Fungal disease suppression by strains of *Pseudomonas* in postharvest on fruit and possible mechanisms of disease suppression. From Wilson and Wisniewski 1989, Francés i *et al.* 1997, Francés 2000, Chalutz and Droby 1998.

Espècie	Patogen	Fruit	Possible mecanisme d'acció
<i>P. cepacia</i>	<i>Mucor</i>	poma	antibiosi
	<i>Botrytis cinerea</i>	pera	antibiosi
	<i>Penicillium digitatum</i>	llimona	antibiosi i altres
	<i>Penicillium expansum</i>	poma i pera	antibiosi
<i>P. syringae</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	pera	inducció de resistència de l'hoste
<i>P. fluorescens</i>	<i>P. expansum</i>	poma i pera	antibiosi

Taula 1.6 Control de malalties causades per fongs fitopatògens mitjançant soques de *Pseudomonas* en experiments en condicions controlades i hivernacle i possibles mecanismes d'acció. Font: Défago i Haas 1990, Burkhead i col. 1994, Montesinos i col. 1996a, Tomashow i Weller 1996. (*) productors de quitinases recombinants.

Table 1.6 Fungal disease suppression by strains of *Pseudomonas* in greenhouses and controlled environment chambers and possible mechanisms of disease suppression. From: Défago and Haas 1990, Burkhead *et al.* 1994, Montesinos *et al.* 1996a, Tomashow and Weller 1996. (*) chitinase-producing recombinants.

Espècie	Patogen	Planta	Possible mecanisme d'acció
<i>P. fluorescens</i>	<i>Stemphylium vesicarium</i>	perera	antibiosi
	<i>Pythium ultimum</i>	cotó	antibiosi (pioluteorina)
	<i>Rhizoctonia solani</i>	cotó	antibiosi (pirrolnitrina)
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	cacahueta	antibiosi
	<i>Thielaviopsis basicola</i>	tabac	antibiosi
	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	blat	antibiosi, competició per ions
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	pèsol	resistència induïda
	Virus de la necrosi del tabac	tabac	resistència induïda
	<i>Pyrenophora tritici-repens</i>	blat	antibiosi
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i>	lli	competició per ions
	<i>Phytophthora megasperma</i> f.sp. <i>glycinea</i>	soja	antibiosi
	<i>Erwinia carotovora</i>	patata	antibiosi, competició per ions
	<i>Sarcladium oryzae</i>	arròs	antibiosi
<i>P. putida</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i>	lli	competició per ions
	<i>Phytophthora megasperma</i> f.sp. <i>glycinea</i>	soja	antibiosi
	<i>Erwinia carotovora</i>	patata	antibiosi, competició per ions
	<i>Fusarium solani</i>	fesol	competició per ions
	<i>Pythium ultimum</i>	pèsol	competició
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>	clavell	antibiosi
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	tomatera	competició per ions
<i>Pythium</i>	cotó, mongetera	competició per nutrients	
<i>P. cepacia</i>	<i>Pythium</i>	cotó, mongetera	competició per nutrients
	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	canya de sucre	antibiosi
	<i>Fusarium</i>	patata	antibiosi
<i>P. aureofaciens</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	blat	antibiosi
	<i>Rhizoctonia solani</i>	pèsol	parasitisme (*)
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Sclerotium rolfsii</i>	pèsol	parasitisme (*)
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>redolens</i>	raves	parasitisme (*)
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	clavell	resistència induïda

1.2.3 L'antibiosi com a mecanisme de biocontrol

La síntesi de productes antimicrobians és el mecanisme d'acció que fins a l'actualitat ha mostrat ser més efectiu i generalitzat en la capacitat de biocontrol. No obstant, aquest mecanisme semblaria no ser un bon candidat per aplicar-lo com a alternativa donat que, probablement, es produiria a la llarga una resistència a l'antibiòtic. Ara bé, un dels punts a tenir en compte a favor de l'ús d'aquest mecanisme en l'estratègia de control de malalties rau en la presumpció de que el problema de resistència als antibiòtics per part dels patògens es desenvoluparia molt a poc a poc. Hi ha dues raons que permeten esperar aquest lent desenvolupament de resistència: en primer lloc, la majoria d'agents de biocontrol produeixen més d'un antibiòtic i la resistència a múltiples antibiòtics ha de succeir únicament amb una freqüència molt i molt baixa i, en segon lloc, la pressió de selecció es veu minimitzada perquè l'exposició del total de la població del patogen als antibiòtics és baixa degut a que són produïts en petites quantitats i solament en els llocs on es troba l'agent de biocontrol (Handelsman i Stabb 1996).

1.2.3.1 Metabòlits produïts per *Pseudomonas*

Diversos treballs mostren la importància en el biocontrol d'un determinat metabòlit sintetitzat per *Pseudomonas* amb propietats antibiòtiques, però en destaquen sobretot els que fan referència al 2,4-diacetilfloroglucinol també anomenat floroglucinol en general (DAPG, PhI), l'àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) i, amb menys freqüència la pirrolnitrina (Prn) (Thomashow i Weller 1988, Vincent i col. 1991, Laville i col. 1992, Mazzola i col. 1992, Shanahan i col. 1992, Pfender i col. 1993, Burkhead i col. 1994, Georgakopoulos i col. 1994a, 1994b, Hill i col. 1994, Nowak-Thompson i col. 1994, 1997, Cronin i col. 1997a, 1997b, Hammer i col. 1997, 1999, Bonsall i col. 1997, Raaijmakers i col. 1997, 1998, 1999a, 1999b, Timms-Wilson i col. 2000). Malauradament, però, el fet de posar de manifest la producció d'un determinat metabòlit no pressuposa l'èxit com a agent de biocontrol d'una determinada soca.

Per poder demostrar la implicació d'un o més metabòlits en el mecanisme d'acció d'un agent de biocontrol és necessari identificar-los i comprovar que un mutant de la soca (obtingut mitjançant mutagènesi amb transposons del tipus Tn5) incapaç de produir aquest metabòlit perd tota o la major part de la capacitat de biocontrol. També cal realitzar la complementació del mutant amb la seqüència gènica de la soca salvatge on s'ha produït la inserció del transposó i que aquesta complementació l'hi retorni les capacitats biocontroladores originals (Fravel 1988, Dowling i O'Gara 1994). Utilitzant aquesta metodologia s'ha demostrat en diferents soques de *P. fluorescens*, la implicació de l'àcid fenazin-1-carboxílic en el control biològic de *Gaeumannomyces graminis* (Thomashow i Weller 1988), del 2,4-diacetilfloroglucinol en el control d'*Erwinia carotovora* (Cronin i col. 1997a) i de l'oomicina A en el control de *Pythium ultimum* (Howie i Suslow 1991). A vegades, però, quan hi ha més d'un mecanisme implicat en el biocontrol pot existir una variació en la importància relativa de cada un dels mecanismes. En alguns casos s'ha comprovat que les

condicions ambientals poden afectar la importància relativa dels mecanismes implicats (Weller i col. 1988).

Els metabòlits que tenen importància en el biocontrol de *Pseudomonas* formen part dels anomenats metabòlits secundaris juntament amb pigments i toxines que no estan sempre presents en la cèl·lula, contràriament als carbohidrats, lípids, proteïnes o àcids nucleics. Els metabòlits secundaris no són importants com a font d'energia o de reserva i són metabolitzats molt lentament a partir de rutes derivades del metabolisme primari. La línia que separa els metabòlits primaris dels secundaris es la majoria de vegades una apreciació subjectiva (Budzikiewicz 1993, Demain 1998).

Pseudomonas produeix una gran quantitat de metabòlits que tenen un efecte inhibidor d'altres microorganismes i alguns d'ells estan implicats en el biocontrol. De l'ampli ventall de metabòlits produïts per *Pseudomonas* del grup fluorescent, solament 3 han estat utilitzats en aplicacions pràctiques en humans: la piocianina, la pirrolnitrina i l'àcid pseudomònic (Leisinger i Margraf 1979); aquest darrer ha estat emprat en el tractament d'infeccions de la pell causades per *Staphylococcus* i en candidiasis cutànies (Whatling i col. 1995).

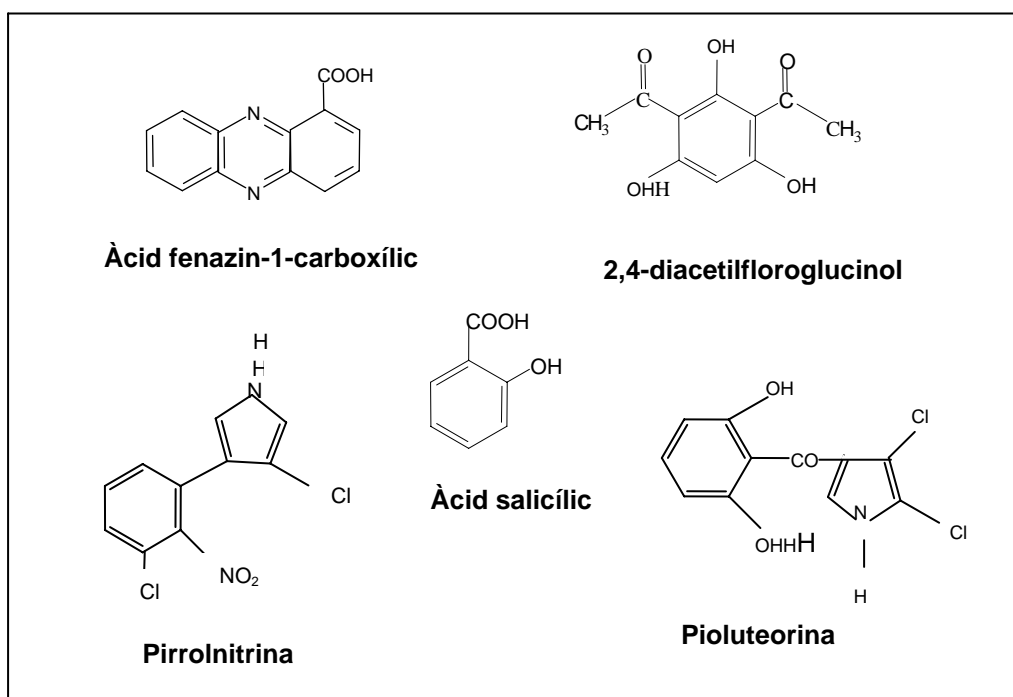


Figura 1.6 Estructura d'alguns dels metabòlits produïts per *Pseudomonas* implicats en el biocontrol de malalties de plantes a camp. Font: Dowling i O'Gara 1994.

Figure 1.6 Structure of some of the bacterial metabolites produced by *Pseudomonas* implicated in the chemical control of plant disease in the field. From Dowling and O'Gara 1994.

Entre els metabòlits secundaris i altres compostos sintetitzats per *Pseudomonas* spp. que han estat implicats en la capacitat biocontroladora, poden citar-se, com a més importants, sideròfors, fenazines, pirrols, pterines i una miscel·lània de metabòlits com acetilfloroglucinols, cianhídric, àcid pseudomònic, sorbistina i àcid salicílic (Défago i Hass 1990, Haas i col. 1991, Budzikiewicz 1993,

Dowling i O'Gara 1994). A la figura 1.6 es mostren les estructures d'alguns d'aquests metabòlits.

Donat que el biocontrol ha estat sovint atribuït a l'antibiosi en la majoria de sistemes que s'han estudiat i que la producció d'aquests metabòlits està influenciada per diferents factors, en l'última dècada l'avenç en l'aïllament, identificació i caracterització de metabòlits produïts per *Pseudomonas*, la recerca dels gens implicats en la biosíntesi i la regulació d'aquests gens ha aportat un valuós coneixement dels ACBs.

Els gens implicats en la biosíntesi dels antibiòtics pioluteorina (Plt), pirrolnitrina (Prn), 2,4-diacetilfloroglucinol (Phl) i l'àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) han estat clonats i completament seqüenciats (Pierson III i col. 1994, 1995, Banger a i Thomashow 1996, Hammer i col. 1997, Nowak-Thompson i col. 1997, 1999). En el moment actual, però, s'estan identificant les funcions codificades pels gens de la Prn (Kirner i col. 1998), Phl (Banger a i Tomashow 1999, Blumer i Haas 2000a, 2000b, Delany i col. 2000, Schnider-Keel i col. 2000), PCA (Wood i Pierson III, 1996, Wood i col. 1997, Mavrodi i col. 1998, Chancey i col. 1999) i Plt (Nowak-Thompson i col. 1997, 1999).

El coneixement dels gens implicats en la biosíntesi del Phl, que ha mostrat ser un dels metabòlits, i en algun cas l'únic, associat amb el control de malalties provocades per *Phytophthora ultimum* en canya de sucre (Fenton i col. 1992), *Thielaviopsis basicola* en tabac (Défago i Hass 1990) i *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* en blat (Keel i col. 1992), va ser un primer pas per estudiar la conservació del locus biosintètic entre soques productores de Phl de diferent origen geogràfic (Keel i col. 1996). L'establiment del nivell de conservació es va realitzar mitjançant la hibridació en condicions d'alta astringència amb una sonda d'una regió de 4.8 Kb de DNA de *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ que contenia els gens. El desenvolupament d'encebadors específics per a l'amplificació d'un dels gens biosintètics d'aquest metabòlit i proves específiques per ser emprades com a sondes (Raaijmakers i col. 1997), han demostrat que *Pseudomonas* productores d'aquest antibiòtic són components clau en el control biològic natural que s'observa en els sòls supressors de la malaltia anomenada "take-all decline" del blat causada per *Gaeumannomyces graminis* (Raaijmakers i Weller 1998).

L'establiment de la importància dels metabòlits implicats en el biocontrol ha fet que en l'actualitat es pugui realitzar una cerca d'agents de biocontrol que podríem anomenar-la "cerca dirigida". Aquesta es realitza provant si els metabòlits ja descrits, tenen acció inhibidora del patògen sota condicions *in vitro*. Si el resultat és satisfactori, pot cercar-se una soca productora del metabòlit i passar a l'estudi de la seva capacitat biocontroladora. Aquest és el cas de l'estudi d'una soca de *P. fluorescens* productora de 2,4-diacetilfloroglucinol per controlar el bacteri patògen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* en patata (Cronin i col. 1997a).

Alhora que s'han anat identificant els gens implicats en la producció dels metabòlits que intervenen en el biocontrol, la regulació d'aquests gens ha esdevingut un nou punt a tenir en compte. La

coneixença d'uns gens controladors globals ha permès explicar el fet de que no sempre s'expressen els gens que codifiquen per a la síntesis dels metabòlits i, per tant, de que no sempre funcioni el biocontrol. També ha obligat a fer una interpretació amb precaució dels resultats obtinguts amb la tècnica de mutagènesi per transposons. En el cas en que solament es coneixes un metabòlit (però no es pugués descartar la implicació d'altres), en realitzar la mutagènesi per transposons podrien obtenir-se dos tipus de mutants. En un primer cas, la inserció del transposó podria haver tingut lloc en un dels gens biosintètics del metabòlit; en conseqüència, el mutant demostraria la importància del metabòlit en qüestió en les seves capacitats biocontroladores. En el segon cas, el transposó podria haver-se inserit en un dels gens reguladors globals i, per tant, el mutant obtingut podria mostrar efectes pleiotròpics (tot i que potser només observariem el seu efecte en el fenotip de la producció del metabòlit d'interès).

1.2.3.2 Regulació i anàlisi genètica de la producció d'antibiòtics en *Pseudomonas*

Les anàlisis genètiques de les soques productores d'antibiòtics implicades en biocontrol han mostrat que hi ha un nombre petit de loci requerits per a la seva producció, i que els gens biosintètics normalment es troben agrupats. Els primers resultats que van posar de manifest l'existència d'una regulació global en l'expressió dels gens implicats en la síntesi de metabòlits secundaris van tenir lloc amb *P. fluorescens* Hv37a en la síntesi d'oomicina A (Gutterson 1990). Aquesta regulació està modulada per un complex de gens que responen a senyals externs. En l'actualitat es coneixen alguns dels mecanismes de regulació global en *P. fluorescens* CHA0 (Laville i col. 1992, Schnider i col. 1995a, 1995b, Carruthers i Haas 1997, Laville i col. 1998, Blumer i Haas, 2000a, 2000b, Schnider-Keel i col. 2000), *P. fluorescens* Pf-5 (Corbell i Loper 1995, Whistler i col. 1998, 2000), *P. fluorescens* BL915 (Gaffney i col. 1993), *P. aureofaciens* 30-84 (Wood i col. 1997, Zhang i Pierson III, 2001) i *P. fluorescens* 2-79 (Mavrodi i col. 1998).

Actualment s'intenta esbrinar el paper de varis mecanismes reguladors que han estat identificats en soques productores d'antibiòtics importants en el biocontrol. D'una manera genèrica, sembla que hi ha dos mecanismes reguladors globals en soques productores de Prn, Phl, Plt i HCN. Un d'ells implica factors sigma alternatius, aconseguint la regulació mitjançant el canvi de la quantitat o activitat d'aquests factors, mentre que l'altre pertany als anomenats sistemes reguladors de dos components.

Quant als factors sigma alternatius, són factors encebadors que permeten a l'RNA polimerasa bacteriana reconèixer promotors diferents i que se separen de la polimerasa quan aquesta ha iniciat satisfactòriament la síntesi. S'ha identificat en diferents bacteris el gen *rpoS* que codifica pel factor sigma alternatiu σ^{38} (també anomenat σ^s). Aquest factor sigma és qui regula l'expressió de diversos gens que s'expressen en la fase estacionària, gràcies al canvi en la relació cel·lular de σ^{70} i σ^{38} . Els nivells dels diferents factors sigma estan regulats en la cèl·lula per mecanismes molt

sofisticats (Kolter i col. 1993). En el cas de la producció de pirrolnitrina s'ha demostrat la regulació dels gens biosintètics per σ^{38} en *P. fluorescens* Pf-5 (Sarniguet i col. 1995). L'estudi d'aquest factor sigma alternatiu ha permès demostrar que la transcripció dels gens biosintètics de la pioluteorina, floroglucinol i proteases extracel·lulars en *P. fluorescens* CHA0 està dirigida pel factor σ^{70} (Schnider i col. 1995a)

Pel que fa referència als sistemes reguladors de dos components, s'han identificat dues proteïnes que en formen part: proteïnes sensores i proteïnes d'unió al DNA. En els bacteris on s'ha identificat aquest sistema de regulació de dos components s'ha anomenat al gen de la proteïna sensora *gacS*, de Global antibiotics and cyanide control, (anteriorment anomenades *lemA* o també *apdA*) i al gen que codifica per a la proteïna d'unió al DNA com a *gacA* en *P. fluorescens* CHA0 (Laville i col. 1992, Carruthers i Hass 1997, Blumer i Haas, 2000a, 2000b) i en *P. fluorescens* Pf-5 (Corbell i Loper 1995, Whistler i col. 1998). Les proteïnes productes d'aquests gens regulen el control de l'expressió gènica dels metabòlits secundaris PhI, Plt, HCN i una proteasa extracel·lular. Darrerament, també s'ha relacionat la regulació del control de l'expressió gènica en la producció de PCA de *P. aureofaciens* 30-84, amb un sistema de regulació de dos components (Chancey i col. 1999). Malgrat tot l'avenç que s'ha produït en la identificació d'aquestes proteïnes transmembrana, que actuen com a sensor, que s'autofosforilen i que són proteïnes relacionades a la família FixJ (Laville i col. 1992, Fuqua i col. 1994), manca resoldre la naturalesa dels senyals fisiològics o ambientals als quals responen. Alguns autors especulen amb la possibilitat de que aquests senyals desconeguts en l'actualitat, puguin ser derivats d'homoserin-lactones (AHL) per homologia amb la regulació de proteases extracel·lulars d'altres microorganismes Gram negatius (Sacherer i col. 1994).

Un dels principals problemes que sembla comportar l'existència de reguladors globals de dos components, és la freqüència en la que es produeixen mutacions quan el medi de cultiu és ric (Duffy i Défago 1995), o també quan es mantenen les soques en refrigeració molt de temps (De Biasio i col. 2000). Estudis recents han mostrat que el zenc i altres minerals estimulen la producció *in vitro* de PhI, Plt i PCA, estabilitzant els gens reguladors i disminuint el nombre de mutacions (Duffy i Défago 1995, 2000). D'altra banda, en les interaccions que tenen lloc dins de cada sistema patogen-agent de biocontrol, s'estableixen uns mecanismes concrets. Aquest és el cas de les relacions entre *P. fluorescens* CHA0 i el fong *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. En aquest sistema el fong produeix àcid fusàric com a factor de patogenicitat que provoca la disminució de la producció de PhI i Plt però no de HCN i proteases, mostrant que el nivell de l'àcid fusàric influeix en la regulació de la producció en un nivell inferior als reguladors globals (*gacA/gacS*), possiblement a nivell de promotor o de transcripció (Duffy i Défago 1997, Duffy i col. 2000).

En els dos sistemes de regulació anteriors, tant per als factors sigma alternatius com per als de les dues proteïnes que formen part dels sistemes reguladors de dos components, s'ha vist que

mutacions en els gens que les codifiquen afecten la supervivència dels bacteris en condicions naturals (Nastch i col. 1994, Sarniguet i col. 1995). Oposadament, s'ha vist que mutacions en els gens biosintètics d'antibiòtics com el PhI no afecten la supervivència del bacteri al sòl (Carrol i col. 1995).

Aquestes proteïnes descrites en els ACBs són funcionalment equivalents a les descrites en el sistema regulador de dos components requerit per a la patogenicitat de *P. syringae* pv. *syringae* (Hrabak i Willis 1992, Rich i col. 1994, Zhang i col. 1995). Aquest paral·lelisme fa pensar que la regulació dels gens biosintètics en els ACBs pot arribar a ser tan complicada com en algunes de les interaccions planta-patogen descrites. Aquest és el cas de la regulació dels gens *hrp* (resposta hipersensible i patogenicitat) (Wei i col. 2000) i els *avr* (gens d'avirulència) que estan regulats per una cascada amb molts components (Xiao i col. 1994).

Cal esmentar en aquest apartat que també hi ha controls addicionals en rutes concretes d'altres antibiòtics, com en el cas del PCA. La transcripció dels gens biosintètics del PCA en *P. aureofaciens* 30-84 està regulada per dos gens *phzR/phzI* els productes dels quals pertanyen a la família de proteïnes reguladores dependents de la concentració cel·lular LuxR/LuxI (Pierson III i col. 1994, Wood i Pierson III 1996, Wood i col. 1997). S'ha observat, també, que mutants deficients en el gen d'activació transcripcional són capaços d'utilitzar molècules sintetitzades per altres bacteris habitants de la rizosfera (Pierson III i Pierson 1996, Pierson i col. 1998). En aquest cas s'ha comprovat que L-N-3-(oxohexanolil)-homoserina lactona actua com a inductor en *P. aeruginosa* (Stead i col. 1996), i a camp en *P. aureofaciens* 30-84 (Wood i col. 1997). Al 1999, però, Chancey i col. van descriure per primera vegada la regulació de l'expressió dels gens *phzR/phzI* mitjançant un sistema regulador de dos components incrementant l'evidència de que aquests sistemes de dos components i els sistemes reguladors mediat per homoserines-lactones (AHL) poques vegades funcionen independentment. L'esquema proposat per aquests autors es mostra a la figura 1.7. Possiblement, hi ha almenys tres nivells de regulació dels gens per a la biosíntesi d'antibiòtics: un primer nivell donat pel coneixement de l'entorn, un segon nivell de regulació global (tipus *gac*, factors sigma) i un tercer nivell gràcies a loci reguladors units als gens que codifiquen el enzims necessaris per a la biosíntesi d'aquests actuant com a repressors transcripcionals, com en el cas del gen *phzR* en la síntesi de PCA (Cook i col. 1995) o del gen *phIF* en el cas del PhI (Delany i col. 2000).

Aquesta similitud que sembla haver-hi entre la regulació de la biosíntesi dels metabòlits secundaris i les interaccions conegudes dels sistemes hoste-patogen, es fa palpable quan es revisen els mecanismes moleculars i les similituds entre les proteïnes reguladores enfront els que utilitzen els bacteris a l'hora de monitoritzar la seva concentració cel·lular (Fuqua i col. 1994). Aquest conjunt de mecanismes moleculars s'han agrupat sota el terme de *quorum sensing*. En el procés de comunicació entre cèl·lules hi ha involucrats processos com la transducció de senyals a través de la membrana citoplasmàtica, la incorporació o lliure difusió del senyal a l'interior de la cèl·lula i la

interacció que té lloc amb els efectors intracel·lulars (Engebrecht i col. 1983, Dunny i Leonard 1997, Greenberg 1997).

Per tot el citat anteriorment i com que la producció de lactones N-acil homoserines és molt més freqüent en *Pseudomonas* associades a plantes que no en les aïllades de sòl (Elasri i col. 2001) s'ha de tenir en compte el suggeriment de que un fenomen com el *quorum sensing* estigui involucrat en les interaccions ACB-Planta-Patogen-Ambient semblant als casos descrits en altres sistemes microbians (Delany i col. 2000, Laue i col. 2000, Notz i col. 2001, Zhang i Pierson III 2001).

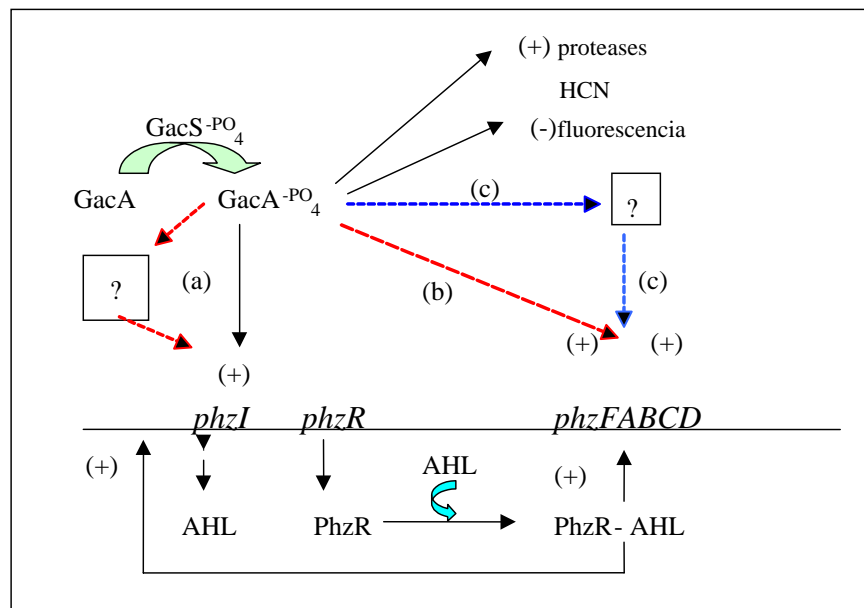


Figura 1.7 Model proposat per al control de la producció de fenazines. GacS respon a la presència d'un senyal encara desconegut fosforilant GacA. GacA controla la producció de fenazines regulant la síntesi de AHL mitjançant el control de la transcripció de *phzI* directament i indirectament (reacció a). GacA controla també la producció de fenazines a un segon nivell, possiblement per la unió directa de GacA (reacció b) o mitjançant una proteïna reguladora controlada per GacA (reacció c). Les fletxes contínues indiquen controls reguladors coneguts, les de color discontinües suggereixen possibles controls reguladors. Els llocs on es produeixen regulacions positives i negatives s'indiquen per més i menys respectivament. Font: Chancey i col. 1999. AHL, homoserines lactones.

Figura 1.7 Model for control of phenazine production. GacS responds to the presence of an unknown signal by transphosphorylating GacA. GacA controls phenazine production by regulating AHL synthesis through transcriptional control of *phzI* either directly or indirectly (reaction a). GacA also controls phenazine production at a second level, possibly by direct binding of GacA (reactions b) or by some unidentified regulatory protein controlled by GacA (reaction c). The solid arrows indicate known regulatory controls, and the dashed colored arrows indicate possible regulatory controls. Places where positive or negative regulation occur are indicated by plus and minus signs, respectively. From: Chancey *et al.* 1999. AHL, homoserin-lactone.

A partir d'aquests coneixements sobre la regulació de la síntesi i de la interacció de l'ACB amb l'ambient, el patogen i l'hoste, serà possible realitzar diferents aproximacions per modificar la producció de metabòlits microbians coneguts. Possibles manipulacions poden dirigir-se a alterar l'expressió dels gens implicats inserint nous promotors, augmentant el nombre de gens o fins i tot inserint aquests en soques que no els contenen, però que tinguin altres característiques

complementàries. Aquest ha estat el cas de la introducció dels gens responsables de la producció de PCA en la soca *P. fluorescens* SBW25, per assolir un major biocontrol (Timms-Wilson i col. 2000)

Si s'arribessin a esbrinar els senyals que activen aquests sistemes de dos components en la regulació de la producció d'antibiòtics, la informació podria tenir molt d'interès en una possible millora d'agents de biocontrol manipulats genèticament. Una possible manipulació en aquest sentit seria possible si, per exemple, es conegués el senyal que interacciona amb un sensor determinat, canviant el domini d'unió al senyal d'un nou sensor pel ja conegut (Corbell i Loper 1995). Altres manipulacions que no impliquen un augment de producció poden estar encaminades a eliminar la transferència de gens de resistència al patògen. La deleció dels gens *tra* del plasmidi que codifica per l'agrocina 84 d'*Agrobacterium radiobacter* K 84 elimina el perill de transferència d'aquest plasmidi al patògen diana *Agrobacterium tumefaciens* procés que el torna resistent a l'agent de biocontrol (Vicedo i col. 1993). D'altra banda, s'ha treballat també en el control biològic de bacteris patògens emprant el mecanisme de competència per part de mutants del mateix patògen manipulats genèticament en els gens involucrats en la patogenicitat (Frey i col. 1994, Tharaud i col. 1997).

1.3 La recerca de marcadors fenotípics i genotípics específics relacionats amb la capacitat de biocontrol en soques de *Pseudomonas*

Per tot el que s'ha citat anteriorment, es pot afirmar que en el biocontrol de les malalties en plantes hi estan implicades interaccions a nivell ecològic (comportament de la soca biocontroladora en el lloc introduït, relacions amb l'hoste i amb la resta de microorganismes autòctons) i molecular (gens biosintètics d'antibiòtics, regulació de la seva expressió). Per tant, aquests aspectes són de gran interès per comprendre els resultats variables i inconsistents que a vegades s'han obtingut en posar a la pràctica els mètodes de biocontrol (Weller 1988).

En aproximacions realitzades en la identificació d'ACBs que suprimeixen malalties amb mecanismes comuns, s'ha observat que soques de la mateixa espècie que produeixen el mateix antibiòtic poden diferir en l'eficiència per exercir el biocontrol. Cal esmentar també que soques d'espècies diferents i inclusivament dins dels grups d'homologia rRNA de *Pseudomonas* poden produir el mateix antibiòtic, com es mostra a la taula 1.7.

Si afegim, a més, la variabilitat obtinguda en els assaigs de biocontrol amb una mateixa soca, tant en el laboratori com en els miniassaigs o assaigs en condicions controlades i a camp, es fa palesa la pobre correlació entre els fenotips i els genotips de les soques biocontroladores. És a dir, el mateix bacteri pot haver sofert canvis en el seu genoma com ara mutacions, o bé les condicions d'estudi no permetien l'expressió de trets importants per al biocontrol. La manca d'eficàcia al canviar d'ecosistema ha estat documentada recentment per Notz i col. (2001) al demostrar que l'expressió

Taula 1.7. Soques de *Pseudomonas* en que s'ha demostrat la producció de pirrolnitrina, floroglucinol i àcid-fenazin-1-carboxílic.**Table 1.7.** *Pseudomonas* strains producing pyrrolnitrin, phloroglucinol and phenazine 1-carboxylic acid.

Metabòlit	Soca	Referències
Pirrolnitrina	<i>P. aureofaciens</i> PGS12	Georgakopoulos i col. 1994a
	<i>P. cepacia</i> B37W	Burkhead i col. 1994
	<i>P. fluorescens</i> BL915	Hammer i col.1997
	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	Pfender i col. 1993
	<i>P. cepacia</i> NB1	El-Banna i Winkelmann, 1998
	<i>P. pyrocinosa</i>	Arima i col. 1964
	<i>P. cepacia</i> 5.5B	Cartwright i col. 1995
	<i>P. aeruginosa</i>	Vincent i col. 1991
	<i>P. fluorescens</i> CHA0	Duffy i Dèfago 1999
	<i>P. aureofaciens</i> 5097 (ATCC 15226)	Vincent i col. 1991
<i>P. cepacia</i> In-b-6854	Rosales i col. 1995	
Floroglucinol	<i>P. fluorescens</i> Q2-87	Shanahan i col. 1992
	<i>P. fluorescens</i> CHA0	Laville i col. 1992
	<i>P. fluorescens</i> F113	Cronin i col 1997a
	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	Nowak-Thompson i col.1994
	<i>P. aurantiaca</i>	Garagulya i col. 1974
	<i>P. fluorescens</i> S272	Yuan i col. 1998
	<i>P. putida</i> In-b-1821	Rosales i col. 1995
Àcid fenazin-1-carboxílic	<i>P. aureofaciens</i> 30-84	Vincent i col. 1991
	<i>P. aureofaciens</i> PGS12	Georgakopoulos i col. 1994a
	<i>P. fluorescens</i> 2-79	Thomashow i Weller 1988
	<i>P. aureofaciens</i> 5097	Vincent i col. 1991
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	Sted i col. 1996
	<i>P. aeruginosa</i> Mac 436	Chang i Blackwood 1968
	<i>P. aureofaciens</i> 5097 (ATCC 15226)	Vincent i col. 1991
* <i>P. chlororaphis</i> PCL1391	Dekkers i col. 2000	

* s'ha descrit la producció de fenazin-1-carboximida. * this strain produces phenazine-1-carboximide

dels gens biosintètics implicats en la producció de floroglucinol és diferent entre sis híbrids de blat de moro. Donat que part del genoma dels bacteris no s'expressa constitutivament i requereix la inducció per senyals, pot ser que s'observi una plasticitat fenotípica elevada. Aquesta plasticitat fenotípica ha estat descrita en el bacteri fitopatogen *P. syringae* observant-se diferències considerables en la supervivència com a epífit i en la capacitat de colonització, depenent de si les cèl·lules procedien de cultius de laboratori o de les plantes (Wilson i Lindow 1993).

S'ha observat també que en soques de *P. aeruginosa* aïllades de pacients crònics de fibrosi quística es produeixen canvis fenotípics d'adaptació del bacteri com canvis en la mobilitat i una alteració en l'expressió de substàncies mucoides, mantenint però, una estabilitat genotípica que es va determinar mitjançant l'anàlisi dels polimorfismes dels fragments d'amplificació múltiple arbitrària obtinguts amb la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (RAP-PCR). Aquests resultats suggereixen que els canvis fenotípics d'adaptació podien potenciar la capacitat del bacteri per sobreviure en el tracte respiratori del pacient (Mahenthalingam i col. 1996).

També s'ha descrit en *P. fluorescens* SBW25 i *Ralstonia* (abans *Pseudomonas*) la diversificació d'adaptacions fenotípiques en la morfologia de la colònia com a resposta a ambients heterogenis (Rainey i Travisiano 1998, Riley i col. 2001), i en soques de *P. aureofaciens* s'han observat canvis fenotípics en relació a la composició d'àcids grassos de la membrana i en la capacitat d'utilització de diferents fonts de carboni, després de ser inoculades al sòl (Germida i col. 1998).

En els apartats anteriors, s'ha comentat que fins a l'actualitat l'estudi dels bacteris en el camp del biocontrol ha passat d'enfocar-se a un nivell pràctic (recerca dels ACBs, assaigs en hivernacles, estudis a nivell fenotípic) a ser-ho a un nivell genètic molt concret com és la identificació dels gens biosintètics dels metabòlits implicats en el biocontrol i el desenvolupament de metodologies per tal de poder monitoritzar els ACBs. Manquen, però, estudis a un nivell que faci de pont entre els treballs més pràctics i els de nivell molecular que aporta la genètica dels gens biosintètics.

Donat que els resultats en la classificació o caracterització a nivell genotípic i fenotípic no sempre es correlacionen, l'ús de tècniques que permetin la caracterització genotípica dels ACBs podria esdevenir una eina útil en el seu coneixement. Amb l'estudi tant fenotípic com genotípic de les soques biocontroladores es pretén aconseguir una aproximació molecular capaç de seleccionar antagonistes efectius en un temps relativament curt (Shena i col. 2000). Si aïllats amb el mateix fenotip poden diferir en el genotip i en l'activitat com a ACB (Leibinger i col. 1997), la caracterització genètica pot ser un procediment molt valuós per cercar i explotar la variabilitat genètica en els agents de biocontrol així com per augmentar l'eficàcia dels procediments de prospecció.

1.3.1 La caracterització genòmica. Aplicació a l'estudi de bacteris actius en el control biològic de malalties

En els últims 25 anys, arran del desenvolupament de les tècniques de seqüenciació del 16S rRNA i 16S rDNA que van revolucionar la filogènia i la taxonomia bacteriana, va començar a realitzar-se una aproximació a la sistemàtica bacteriana anomenada taxonomia polifàsica. El terme de taxonomia polifàsica va ser introduït als anys 70 i es basa en la informació que pot obtenir-se mitjançant la integració de dades fenotípiques, genotípiques i filogenètiques i emprar-les en la classificació a tots els nivells (Colwell 1970, Vandamme i col. 1996). La informació genotípica és la derivada del DNA i RNA, la fenotípica la derivada de les proteïnes i les seves funcions, dels

marcadors quimiotaxonòmics i dels trets expressats, i la filogenètica de les relacions evolutives mitjançant l'estudi del 16S rDNA (Figura 1.8). S'han realitzat anàlisis polifàsiques en el gènere *Xanthomonas* (Bouzar i col. 1999), en estudis de diversitat intraespecífica en *Vibrio vulnificus* (Arias i col. 1997), *Ralstonia solanacearum* (Jaunet i Wang 1999) i en una soca de *Burkholderia* (Cain i col. 2000).

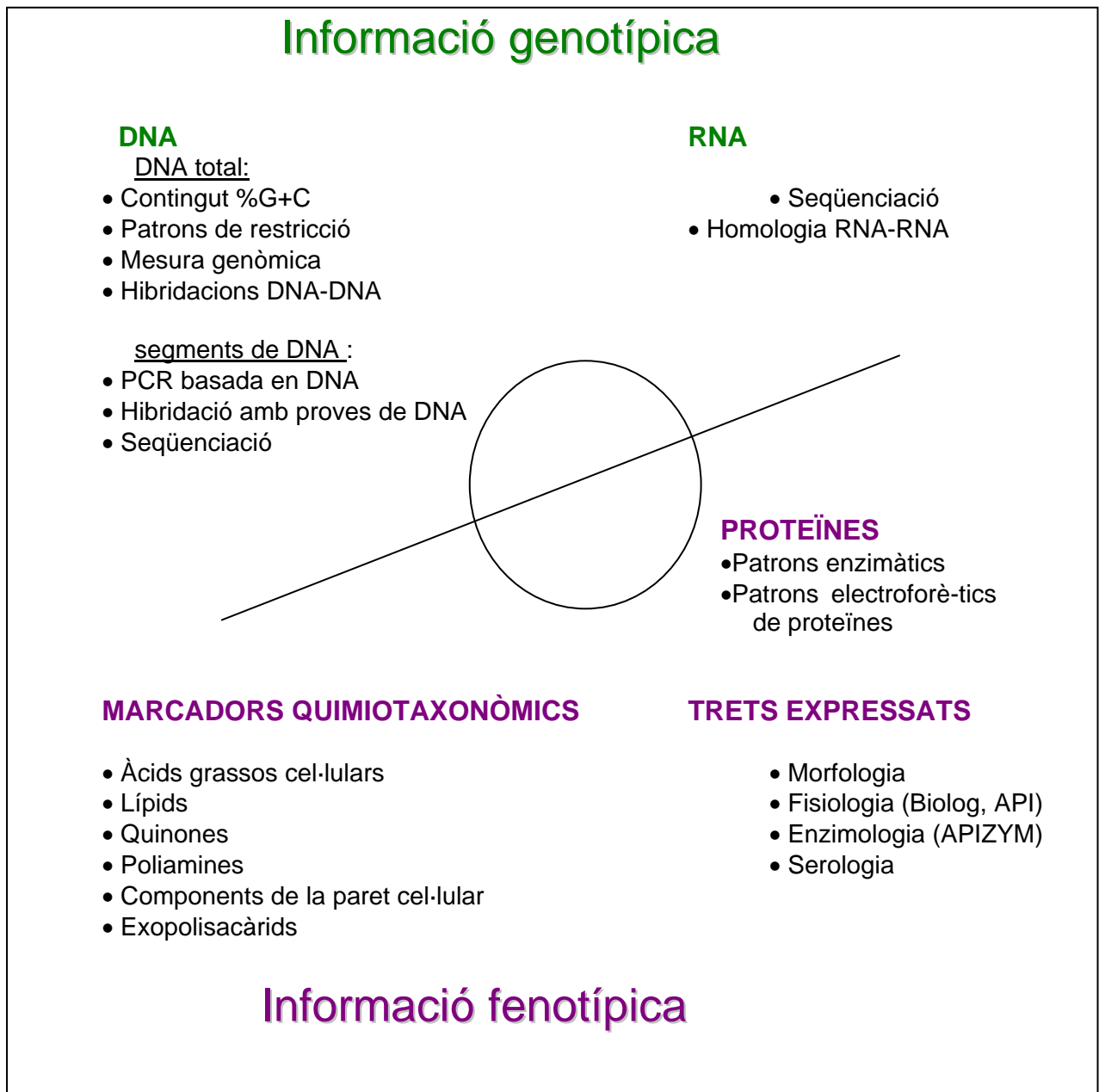


Figura 1.8 Dades fenotípiques i genotípiques que poden integrar-se en la taxonomia polifàsica. Font: Vandamme i col. 1996.

Figure 1.8. Phenotypic and genotypic traits that can be integrated in polyphasic taxonomy. From Vandamme *et al.* 1996.

Utilitzant aquesta nova aproximació polifàsica, en el gènere *Pseudomonas*, també s'han realitzat extensives revisions en el sistema de classificació de les espècies en base a caracteritzacions fenotípiques i genotípiques enfront la taxonomia establerta (Palleroni 1993). Un altre terme introduït recentment arrel dels estudis d'hibridació DNA/DNA dins el gènere *Pseudomonas* és el concepte de genomovar, també anomenat espècie genòmica, grup genòmic, genospècie o genomoespècie. El terme genomovar defineix grups de soques dins la mateixa espècie que, presentant similituds fenotípiques elevades, comparteixen un baix nivell de similitud en les hibridacions DNA/DNA. Els genomovars han estat proposats, per exemple, en les espècies *Pseudomonas stutzeri* (Roselló i col. 1991), *Burkholderia solanacearum* (Vandamme i col. 1997) i en un grup de *Pseudomonas* fluorescents aïllades de necrosi medul·lar de la tomatera, però que no pertanyien a l'espècie *P. corrugata* considerat l'agent causal de la malaltia (Sutra i col. 1997).

Cada un dels mètodes emprats per la taxonomia polifàsica permet un cert nivell de classificació des de família, gènere, espècie, biovar i soca. Cada mètode té, també, els seus avantatges i inconvenients en relació a l'aplicabilitat, reproducció dels resultats obtinguts, requeriment d'equipament i nivell de resolució. A la figura 1.9 es presenta un esquema indicant els nivells de resolució de les diferents tècniques.

Si bé la comparació més acurada entre dues soques és, sens dubte, la comparació en la totalitat de les seves seqüències genòmiques; també és la més difícil de portar a terme degut als requeriments temporals, econòmics i d'equipament. Al 1995, l'Institut de Recerca Genòmica (TIGR The Institute for Genomic Research), va publicar la primera seqüència completa d'un genoma bacterià. Evidentment, els esforços han anat dirigits a bacteris que tenen una gran importància en medicina o que tenen aplicació industrial. En l'actualitat, hi ha 30 genomes bacterians completament seqüenciats; entre els que es troben el de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i el del bacteri fitopatogen *Xylella fastidiosa* 9a5c i s'estan seqüenciant altres bacteris fitopatògens com *Xanthomonas campestris* pv. citri, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*; *Agrobacterium tumefaciens* C58 i *Ralstonia solanacearum* GMI1000. Quant a *Pseudomonas*, s'està seqüenciant el genoma de *P. syringae* pv. *tomato*, *P. putida* KT2440 i PRS1 (dades extretes de Microbial Genomes Blast Databases NCBI i TIGR, Pierson III i Ishimaru 2001). Tot i el desenvolupament de la seqüenciació en l'actualitat, les altres metodologies que permeten fer d'una manera relativament ràpida, senzilla i de forma generalitzada una comparació genòmica, són encara més emprades per realitzar aquestes caracteritzacions. Tal i com es descriuen en l'apartat següent, aquestes metodologies es basen en comparar un nombre limitat de seqüències com pot ser la seqüència específica de tall d'un enzim de restricció o la presència de determinades seqüències conservades i repetides al llarg del genoma.

Els mètodes de subtipificació molecular normalment estan encaminats a complementar els mètodes de caracterització fenotípica. Si les agrupacions obtingudes amb els dos tipus de caracterització es relacionen, es podran predir característiques fenotípiques a partir de la caracterització genotípica.

S'ha de tenir en compte però, que un dels inconvenients més grans de les metodologies genotípiques rau en la gran despesa econòmica que comporta enfront les caracteritzacions fenotípiques. A la taula 1.8 es mostra segons Wiedmann i col. (2000), la diferència de cost entre dos mètodes de caracterització basats en el DNA envers un mètode fenotípic.

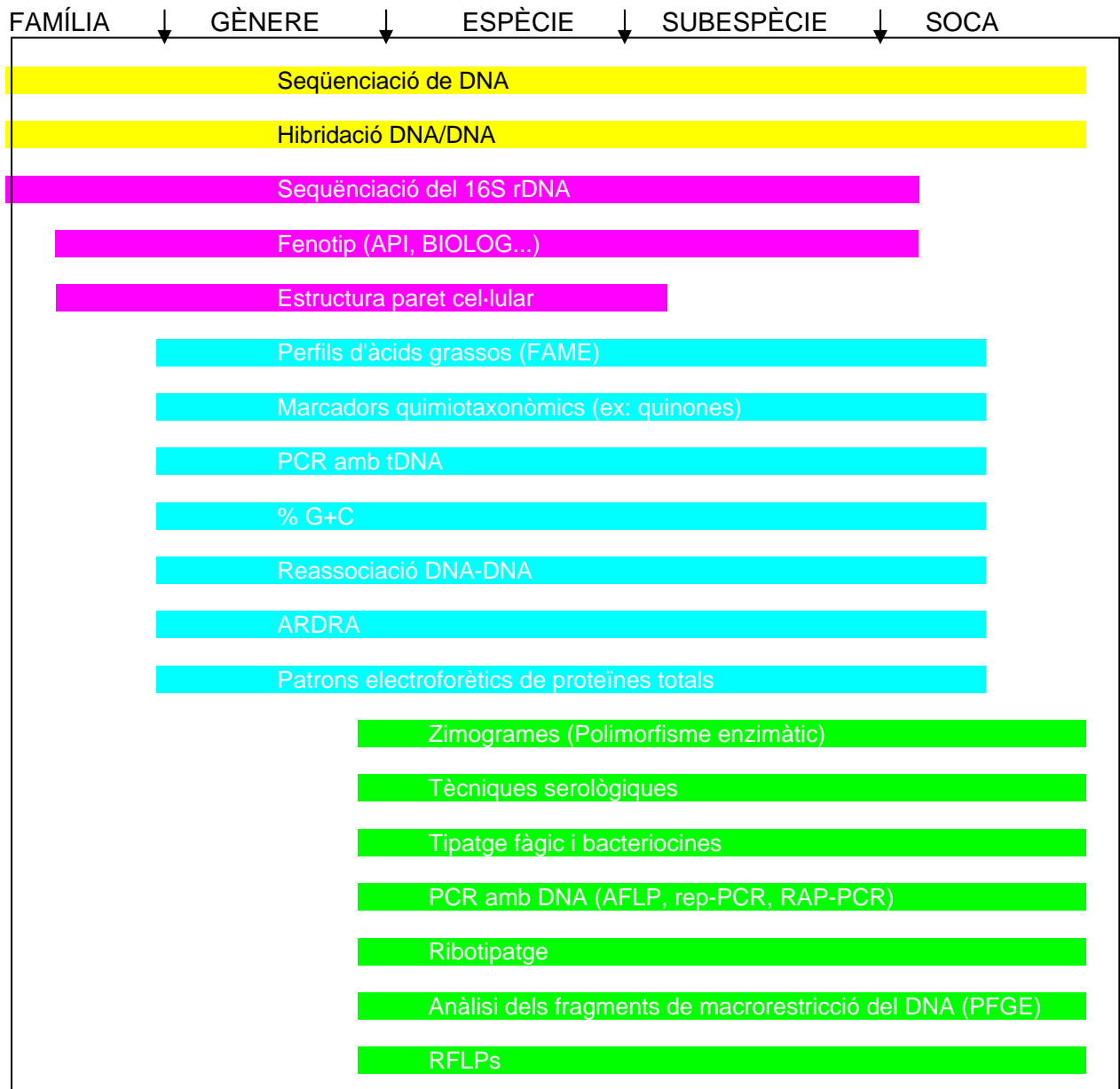


Figura 1.9 Nivell de resolució d'algunes de les tècniques emprades per la taxonomia polifàsica. ARDRA, anàlisi dels patrons de restricció de DNA amplificat; AFLP, polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats per PCR selectivament a partir de fragments de restricció genòmica; RFLP, polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció; RAP, polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats per PCR amb encebadors arbitraris; PFGE, electroforesi en camp polsant; rep-PCR, polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats per PCR amb encebadors corresponents a seqüències de DNA repetitiu altament conservades. Font: Modificat de Rademaker i de Bruijn 1998 i Vandamme i col. 1996.

Figure 1.9 Relative resolution levels of various techniques used by polyphasic taxonomy. ARDRA, amplified DNA restriction analysis; AFLP, amplified fragment length polymorphism; RFLP restriction fragment length polymorphism; RAP, Randomly amplified polymorphism; PFGE, pulsed field gel electrophoresis; rep-PCR, length polymorphism amplified fragments using primers complementary to repetitive highly conserved DNA sequences. From: Modified from Rademaker i de Bruijn 1988 and Vandamme *et al.* 1996.

Taula 1.8 Cost econòmic entre diferents mètodes de tipificació de DNA enfront el mètode fenotípic del sistema Biolog. Font : Wiedmann i col. 2000.

Table 1.8 Economical cost among different DNA fingerprinting methods compared to the phenotypic Biolog method. From Wiedmann et al. 2000.

Mètode	Cost econòmic						
	Cost (en dolars \$)		cost laboral		Cost (\$) / aïllat en 7 anys per:		
	Equipament	material/soca	temps/8 aïllats (h)	cost/aïllat (\$)	500 aïllats/any	1000 aïllats/any	2000 aïllats/any
Ribotipat automatitzat	175000	45	1(\$30)	3.75	98.75	73.75	61.25
Ribotipat manual	11800	10	16(\$480)	60	73.37	71.70	70.84
PFGE	39045	3.5	16 (\$480)	60	74.66	69.08	66.29
Biolog	32263	6.47	2 (\$60)	7.5	23.18	18.57	16.27

Els mètodes de caracterització bacteriana basats en el DNA per la realització de les anàlisis genòmiques es poden dividir en dos grans grups: els mètodes dependents de l' amplificació per la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i els independents de la PCR. Un dels problemes associats a l'ús de les tècniques independents de l'amplificació per PCR descrites és, sense cap dubte, la necessitat de disposar de grans quantitats de DNA per a la realització de les anàlisis. Aquest inconvenient queda resolt amb l'amplificació de DNA mitjançant l'ús de la PCR. Si bé l'amplificació no és pot fer de tot el genoma complet s'han dissenyat i perfeccionat tècniques que donen una visió global del genoma. En altres casos l'amplificació de parts determinades del genoma es considera suficientment vàlida per les anàlisis que es volen portar a terme.

1.3.1.1 Mètodes dependents de l'amplificació per PCR

Els mètodes basats en la tècnica de la PCR es poden classificar per una banda en aquells que permeten una visió global de l'estructura genòmica i que no requereixen el coneixement de seqüències diana de DNA com són l' amplificació múltiple definida (rep-PCR), l'amplificació múltiple arbitrària (RAPs) i l'amplificació selectiva de fragments de restricció genòmica (AFLP-PCR) i per l'altra banda aquelles tècniques que amplifiquen solament una part del genoma emprant determinats gens o gens més universals com els ribosomals.

Amplificació múltiple definida (rep-PCR)

L'amplificació es realitza amb encebadors específics sota condicions d'alta astringència, o sigui amb temperatures d'anellament elevades. Depenent de l'encebador emprat s'anomena Rep-PCR (encebadors d'elements repetitius extragenòmics palindromàtics de 35-40 pb), ERIC-PCR (encebadors de seqüències intergenòmiques enterobacterianes repetitives de consens de 124-127 pb) i Box (encebadors d'una seqüència conservada de 145 pb). En conjunt, però, s'anomena rep-PCR (Stern

i col. 1984, Versalovic i col. 1991, de Bruijn 1992, 1996, Louws i col. 1994,1999, Smith i col. 1995, Laguerre i col. 1997, Rademaker i de Bruijn 1998). En alguns casos també s'ha utilitzat una derivació d'aquesta metodologia més especialitzada on s'han dissenyat encebadors d'elements repetits dins d'un genoma com els dissenyats per l'element IS1112 de *X. oryzae* pv. *oryzae* (George i col. 1997).

Amplificació múltiple arbitrària o amplificació de seqüències desconegudes (RAPs)

En aquesta tècnica solament s'empra un encebador escollit a l'atzar (però amb un contingut %G+C superior a 50), i per tant cal una selecció empírica dels encebadors. Com que les seqüències no són homòlogues a cap tros de DNA concret, la temperatura en el moment d'unió de l'encebador al DNA ha de ser bastant baixa (Welsh i McClelland 1990, Williams i col. 1990, Kelly i col. 1994, Mahenthiralingam i col. 1996, Agius i col. 1997, Clerc i col. 1998). El principal problema de la tècnica rau en la manca de reproducció dels resultats obtinguts. Qualsevol variació en l'extracció del DNA, material emprat o àdhuc el termociclador utilitzat pot variar el patró de fragments amplificats obtingut (Meunier i Grimant 1993, Picard i col. 2000, Tcherneva i col. 2000). Aquesta metodologia no pot tolerar l'ampli ventall de concentracions de DNA que permet la rep-PCR, perquè afecta a la reproducció dels resultats.

Per solucionar el problema de la reproducció dels resultats, s'ha pensat en la utilització de noves estratègies com per exemple, la realització d'un triplicat de cada mostra portat a terme amb diferents temperatures d'anellament mitjançant l'anomenada TAP-PCR (Triplicate arbitrary primer-PCR) (Cusick i O'Sullivan 2000).

Amplificació selectiva de fragments de restricció genòmica (AFLP-PCR)

El DNA total és digerit amb dos enzims de restricció de tall freqüent (dianes de reconeixement de 4 i 6 pb), i seguidament s'incorporen uns adaptadors al final dels fragments. Posteriorment, s'aconsegueix una amplificació selectiva d'aquests fragments emprant com a encebadors seqüències que corresponen als adaptadors (Janssen i col. 1996, Arias i col. 1997). Aquesta metodologia és probablement la que presenta més requeriments pel que fa referència a que és més laboriós, cal força quantitat de DNA, més manipulacions que inclouen digestions i lligacions, així com una resolució dels fragments obtinguts amb gels d'acrilamida. D'altra banda els bons resultats obtinguts han propiciat la millora de la metodologia, utilitzant marcadors fluorescents multicolors que permeten l'anàlisi de resultats amb l'ús d'un seqüenciador automàtic. Una variació d'aquest mètode és l'anomenat ISR-PCR (Infrequent-restriction site PCR) que té alguns dels passos dels AFLPs en comú, malgrat la diferència rau en que en el AFLPs els adaptadors són oligonucleòtids de 18 a 22 pb mentre que en els ISR-PCR un dels adaptadors té 18-22 pb i l'altre solament 7 (Garaizar i col. 2000). Aquest canvi fa que l'anàlisi sigui més senzill al reduir-se el nombre de fragments obtinguts i per tant simplificant l'anàlisi dels resultats.

Dels tres mètodes anteriors, el rep-PCR i AFLP s'han emprat molt en l'estudi de la diversitat bacteriana a nivell de subespècie o soca i s'han realitzat normalment en patògens degut al gran poder de discriminació perquè els patògens s'han mostrat en general molt homogenis genèticament. Cal però destacar el fet de ambdues metodologies presenten una gran complexitat en els perfils obtinguts, difícilment analitzables visualment a cop d'ull i són molt laboriosos i subjectius. Per solucionar aquesta complexitat solen analitzar-se els gels amb una aproximació basada en corbes densitomètriques més que no amb bandes definides. L'extensiu ús d'aquesta tècnica ha permès que en l'actualitat ja hi hagin al mercat Kits comercials que faciliten el treball al laboratori, i el seu ús és també cada vegada més ampli, utilitzant-se per fongs, plantes i animals (Bleas i col. 1998).

Amplificació simple definida

Per alguns autors també s'inclou en aquest grup de metodologies dependents de la PCR, l'ús de les anàlisis de restricció aplicable a qualsevol producte amplificat i que genèricament s'ha anomenat PCR-RFLP (Louws i col. 1999). L'anàlisi més emprada és l'ARDRA que consisteix en l'anàlisi de restricció de DNA ribosomal amplificat (rDNA) seguit de la digestió dels fragments obtinguts. A vegades poden agrupar-se diferents anàlisis de patrons obtinguts amb el 16S rDNA, les regions ITS o de qualsevol altre gen d'interès. Cal tenir en compte que, si bé en les anàlisis filogenètiques l'estudi del 16S rDNA ha esdevingut una eina molt útil (Woese 1987), no dóna una visió global de l'organització genòmica del bacteri, sinó solament en una part molt concreta com són els gens que codifiquen pels ribosomes.

La caracterització molecular mitjançant les anàlisis per PCR-RFLP dels gens ribosomals 16S rDNA i en l'actualitat també de l'espai intergènic 16S-23S rDNA ha permès la identificació i caracterització de bacteris fitopatògens a nivell de gènere (De Paradis i Roth 1990, Maes 1993), d'espècie (Leach i col. 1990, Laguerre i col. 1994, 1996) i a nivell intraespecífic (Graham i col. 1990, Leach i col. 1992, Jaunet i col. 1995). En el grup de les *Pseudomonas* fluorescents també ha estat realitzada la caracterització molecular dels gens ribosomals amb l'anàlisi dels patrons de restricció del 16S rDNA ribosomal amplificat per PCR (ARDRA) (Laguerre i col. 1994) i la seqüenciació de regions variables del 23S rDNA amb finalitats taxonòmiques (Christensen i col. 1994). L'ús de les anàlisis dels polimorfismes en la longitud en els fragments de restricció de l'amplificat per PCR corresponent a l'espai entre el 16S i el 23S rDNA (RFLP-ITS) també s'ha emprat però no tant amb caràcter taxonòmic sinó més d'agrupació de diferents soques i en estudis d'ecologia microbiana (Natsch i col. 1997, Sharifi-Tehrani i col. 1998, Cho i Tiedje 2000).

L'anàlisi dels operons ribosomals (*rrn*) ha estat un dels mètodes més emprats per determinar les relacions filogenètiques entre microorganismes perquè han estat considerats com a rellotge molecular de l'evolució (Woese 1987). Els operons ribosomals (*rrn*) contenen tres gens en el següent ordre: l'*rrs* que codifica per la subunitat petita dels ribosomes (16S), l'*rrl* per la subunitat

més gran (23S) i el tercer que codifica pel 5SRNA. Entre els gens *rrs* i *rrl* es troba una seqüència que no codifica pels ribosomes anomenat espai intern transcrit (ITS o ISR). Aquestes seqüències d'una longitud entre les 100-1100 pb, segons les espècies, presenten una estructura secundària i normalment codifiquen per alguns tRNA.

El nombre d'operons ribosomals en el genoma bacterià és variable, oscil·lant entre 1 i 14 operons. A més, a vegades aquests operons poden tenir el mateix ITS i en altres casos degut a la presència de diferents ITS la longitud entre els operons pot ser variable. En *E. coli* s'ha demostrat l'existència de 7 operons, 3 contenen una ITS amb dos gens de tRNA i 4 contenen una ITS amb un sol tRNA (Brosius i col. 1981). En *P. aeruginosa* i en el cianobacteri *Nostoc* s'han descrit 4 còpies de l'operó (Hartmann i col. 1986, Iteaman i col. 2000).

En el gènere *Bacillus* s'han descrit de 8 a 12 operons ribosomals amb la presència de 3 ITS de diferent longitud (Nagpal i col. 1998, Daffonchio i col. 2000). Si bé el nombre de tRNA sol ser de 1 a 2, en *Vibrio* s'han descrit 3 i 4 tRNA en un mateix ITS (Chun i col. 1999).

Quant a la longitud d'aquests ITS, s'han descrit ITS de 900-1100pb en *Agrobacterium* (Ponsonnet i Nesme 1994), 440-530 pb en *E. coli* (Brosius i col. 1981), 400pb en *Frankia* (Normand i col. 1992), 800pb en *Nitrobacter* (Navarro i col. 1992). També hi ha espècies que han mostrat un alt nivell de polimorfismes tant en la longitud com en la seqüència, en *Lactobacillus* s'han descrit ITS de 200 i 500-600 pb (Tannock i col.1999), de 350 i 600 en *Listeria* (Jensen i col. 1993) i a vegades també s'ha descrit la presència de longituds diferents d'ITS entre soques de la mateixa espècie (Doignon-Bourcier i col. 2000). En *Pseudomonas* la mida dels ITS és d'unes 565 pb en *P. syringae* i de 515-600 pb en *P. fluorescens* (Manceau i Horvais 1997, Gill i col. 1994, Cho i Tiedje 2000) i s'ha demostrat la presència de dos tRNA que codifiquen per l'isoleucina i l'alanina (tRNA^{iso}, tRNA^{ala}) (Gill i col. 1994).

En el cas de l'existència de diferents longituds dels ITS en una mateixa soca, i per tant, diferents mides dels amplificats, pot succeir que es formin heteroparelles que són artefactes que s'obtenen quan les seqüències 5'-3' de dues regions ITS són homòlogues (West i Adams 1997). Per a poder determinar si corresponen a parelles homòlogues de diferent mida o a heteroparelles artificials cal la seva resolució en un gel d'electroforesi desnaturalitzant on sols es poden visualitzar les parelles homòlogues (Iteaman i col. 2000). Malgrat tot, també s'ha emprat l'anàlisi conjunt de les parelles homo i hetero per a detectar diferències entre i dintre espècies (Daffonchio i col. 2000).

En l'actualitat l'avenç en la tècnica de seqüenciació de DNA ha permès que molts dels estudis es portin a terme seqüenciant els amplificats. N'obstant, si s'ha de realitzar l'anàlisi amb un gran nombre de soques, el mètode més ràpid i versàtil per estudiar els polimorfismes en la seqüència ha estat l'anàlisi de les dianes de restricció per endonucleases (ARDRA). La resolució de l'anàlisi depèn de la part de l'operó estudiat, i malgrat la seva mida menor, s'ha observat una variabilitat més

gran en les regions ITS que es troben sota una pressió evolutiva menor enfront els *rrs* i *rrl*.

L'ús de la variabilitat en les seqüència de l'espai intergènic 16S-23S rDNA ha esdevingut un complement important a les anàlisis ARDRA, sobre tot pel que fa referència a comparar espècies bacterianes dins del mateix gènere, com ha estat el cas de *Bacillus* (Nagpal i col. 1998, Daffonchio i col. 2000), *Agrobacterium* (Ponsonnet i Nesme 1994), *Nitrobacter* (Navarro i col. 1992), *Lactobacillus* (Tannok i col. 1999) i *Pseudomonas fluorescens* i *P. putida* (Gill i col. 1994). En aquests sentit l'anàlisi dels ITS per si sol també ha permès separar en agrupacions de patovars i genomoespècies soques de *P. syringae* (Manceau i Horvais 1997), utilitzant 14 enzims, i si amb els gens *rrs-rrl* *P. syringae* i *P. viridiflava* no es podien diferenciar, els patrons obtinguts amb els ITS eren determinatius de l'espècie. En general però, s'ha utilitzat l'anàlisi dels ITS per a determinar la diversitat genètica entre soques més que per realitzar una afiliació a nivell d'espècie.

El polimorfisme de seqüència que mostren les regions ITS s'ha utilitzat també pel disseny d'encebadors i l'observació de la mida de l'amplificat (sense l'ús de restriccions) i ha permès separar gèneres i espècies bacterianes (Jensen i col. 1993, Berthier i Erlich 1998). Una altra estratègia emprada per avaluar diferències dels ITS a nivell de soques en la mateixa espècie, és la tècnica de la DGGE (Electroforesi en gradient desnaturalitzant), que permet separar fragments del mateix nombre de pb però que presenten seqüències diferents (Buchan i col. 2001). Altres autors han dissenyat encebadors dirigits a tDNA dins aquests ITS, ja que s'espera que siguin més estables en l'evolució (Welsh and McClelland 1991).

Una altra variació en la mateixa metodologia rau en l'amplificació conjunta del 16S rDNA i l'espai ITS entre aquest i el 23S rDNA. D'aquesta manera la probabilitat de detectar polimorfismes de seqüència augmenta a l'incrementar la mida del fragment amplificat. En el cas d'*Agrobacterium*, el poder discriminatori era el mateix, o superior que l'obtingut mitjançant el serotipat, RFLP clàssic, resistència a antibiòtics i patrons de proteïnes (Ponsonnet i Nesme 1994).

Pel que fa referència als fongs, l'amplificació dels ITS s'ha utilitzat també àmpliament, per exemple en els agents de biocontrol *Trichoderma harzianum* que se separaven d'altres espècies de *Trichoderma* spp. (Ospina-Giraldo i col. 1999, Hermosa i col. 2000). En el cas dels patògens, l'anàlisi permet també la diferenciació intragrup de 2 agrupacions de *Rhizoctonia solani* (Toda i col. 1999). D'altra banda, regions variables de l'ITS de l' rDNA nuclear s'han utilitzat en *Phialophora gregata* com a marcadors moleculars per identificar poblacions a nivell de subespècie. En aquest cas es van dissenyar dos encebadors específics que flanquegen una regió variable i que permeten amplificar tres productes de diferent mida que separaven els 3 genotips (Chen i col. 2000).

La realització d'anàlisi ARDRA o anàlisi ITS-RFLP en agents de biocontrol, s'ha portat a terme solament en un grup de *Pseudomonas* spp. productores de floroglucinol (Keel i col. 1996, Nastch i col. 1997, 1998, Sharifi-tehrani i col. 1998, Picard i col. 2000). No s'ha trobat cap referència

bibliogràfica en agents de biocontrol bacterians que incloguessin les dues anàlisis conjuntament.

1.3.1.2 Mètodes independents de l'amplificació per PCR

Entre els mètodes independents de l'amplificació per PCR es poden citar com a més importants les cinètiques de reassociació del DNA, els perfils de plasmidis, les tècniques basades en anàlisis de restricció i posterior hibridació amb sondes, i les anàlisis dels polimorfismes en la longitud dels fragments de macrorestricció genòmica emprant enzims de tall poc freqüent i resolts amb l'electroforesi en camp polsant (PFGE).

El primer mètode, el més directe, es basa en l'homologia DNA-DNA mitjançant la cinètica de reassociació del DNA de parells d'aïllats per comparar la seva homologia. El segon, o sigui la comparació dels perfils de plasmidis, caldria considerar-lo parcial. El tercer mètode es basa en la realització de la digestió total del genoma bacterià amb enzims de restricció de tall freqüent i anàlisis dels patrons resultants (REA) o anàlisis dels patrons després de la hibridació amb proves genòmiques específiques (RFLP), com ara seria el ribotipat si les proves són els gens ribosomals. El darrer mètode i més actual és una derivació de l'anterior en la que s'utilitzen enzims de restricció de tall poc freqüent, seguit de la separació dels fragments generats mitjançant l'electroforesi de camp polsant (PFGE) i l'anàlisi dels patrons obtinguts (MFRLP). L'ús de la PFGE (Maule 2000) permet resoldre els problemes associats als REA amb enzims de restricció de tall freqüent pel que fa referència a la dificultat d'anàlisi dels patrons obtinguts.

1.3.2 Caracterització subespecífica de bacteris mitjançant el polimorfisme dels fragments de macrorestricció genòmica del DNA

Entre les tècniques emprades en el desenvolupament de les tecnologies del DNA recombinant, la separació per mides de molècules de DNA utilitzant l'electroforesi en gels de poliacrilamida i agarosa ha estat una tècnica crítica. Un dels principals problemes de l'electroforesi convencional rau en la manca de separació de les molècules més grans de 30-50 Kb.

La tècnica de la PFGE és capaç de separar molècules de DNA compreses entre les 10 Kb i les 10 Mb. En línies generals, en aquesta electroforesi es canvia periòdicament la direcció del camp elèctric en el gel i, per tant, les molècules s'han de reorientar contínuament en la direcció del camp, produint-se una migració en funció de la seva llargària i seguint la direcció resultant del dos camps. Juntament amb la posta a punt de la PFGE, cal destacar també la importància del desenvolupament de nous protocols per a l'extracció de DNA intacte i l'ús d'enzims de restricció de baixa freqüència de tall. Els protocols d'extracció de DNA es basen en l'obtenció de molècules de DNA intactes incloses en blocs d'agarosa que, degut a la seva fragilitat, podrien trencar-se durant les manipulacions. Això és important, tant en el moment de tenir la molècula circular de DNA abans de digerir com després de la digestió, ja que el resultat de les restriccions poden ser fragments de DNA

molt grans amb l'ús dels enzims de restricció de tall poc freqüent. Per escollir l'enzim adequat en cada cas es té en compte tot un seguit de característiques del bacteri, com ara el contingut amb %G+C i la longitud de la seqüència de reconeixement (McClelland i col. 1987).

Si l'electroforesi convencional normalment es realitza amb un camp elèctric uniforme que no canvia la intensitat ni la direcció, la PFGE utilitza almenys dos camps elèctrics que s'activen alternativament en un angle determinat en la direcció de migració de les molècules. Els diversos sistemes de PFGE estan formats per una cubeta d'electroforesi acoblada a un microprocessador que controla un determinat nombre de variables que influeixen en el comportament del DNA (voltatge, duració del pols en cada direcció i, en alguns sistemes, l'angle que formen els dos camps elèctrics alternants). Un dels paràmetres més importants a tenir en compte i que afecta la separació de les molècules és l'angle de camp. Els angles que es defineixen en la PFGE estan entre els camps aplicats i entre els camps i la direcció neta de migració de la mostra; α i β són els angles de camp, entre la direcció neta de la migració i cada un dels camps elèctrics aplicats, i θ és l'angle d'interacció, sent igual a la suma absoluta dels valors de α i β (Fig. 1.10).

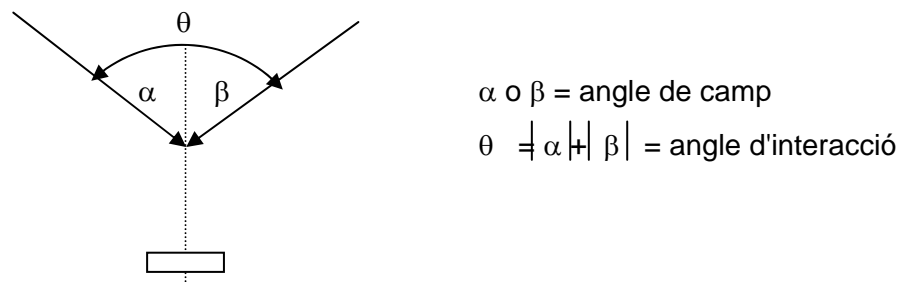


Figura 1.10 Representació dels angles definits en la PFGE.
Figure 1.10 Representation deployment angles in PFGE

La primera tècnica aplicada va ser l'electroforesi de camp polsant de gradient de camp (PFGGE: Pulsed-field gradient gel electrophoresis) descrita per Schwartz i Cantor al 1984. En aquesta nova electroforesi es distribuïen un conjunt d'elèctrodes puntuals disposats en direcció Nord/Sud i Est/Oest que provocaven una migració en diagonal dels fragments de DNA en el gel (Fig. 1.11 A). Posteriorment, s'han anat dissenyant variacions de la tècnica en funció de l'angle format pels dos camps elèctrics que s'apliquen al gel. Els sistemes més emprats són :

Electroforesi de camp alternant ortogonal (OFAGE: Orthogonal field alternation gel electrophoresis; Carle i Olson 1984) on els elements negatius són més llargs que els positius (poden substituir-se els elèctrodes puntuals per lineals, o solament modificar el nombre d'elements). Els camps elèctrics són aplicats perpendicularment al gel, obtenint-se una migració no ben rectilínia del DNA (Fig. 1.11 B).

Electroforesi d'inversió de camp (FIGE: Field inversion gel electrophoresis; Carle i col. 1986).

Semblant a una electroforesi convencional però amb inversions periòdiques als camps elèctrics amb un angle θ de 180° , mantenint una relació de 3:1 (endavant i endarrera) obtenint també una migració lineal (Fig. 1.11 C).

Electroforesi de camp elèctric perifèric homogeni (CHEF: Contour clamped homogeneous electric field; Chu i col. 1986).

Es modificà la distribució dels elèctrodes al voltant del perímetre d'una cambra hexagonal, obtenint un corrent uniforme i aconseguint una migració del DNA perpendicular als pouets (Fig. 1.11 D).

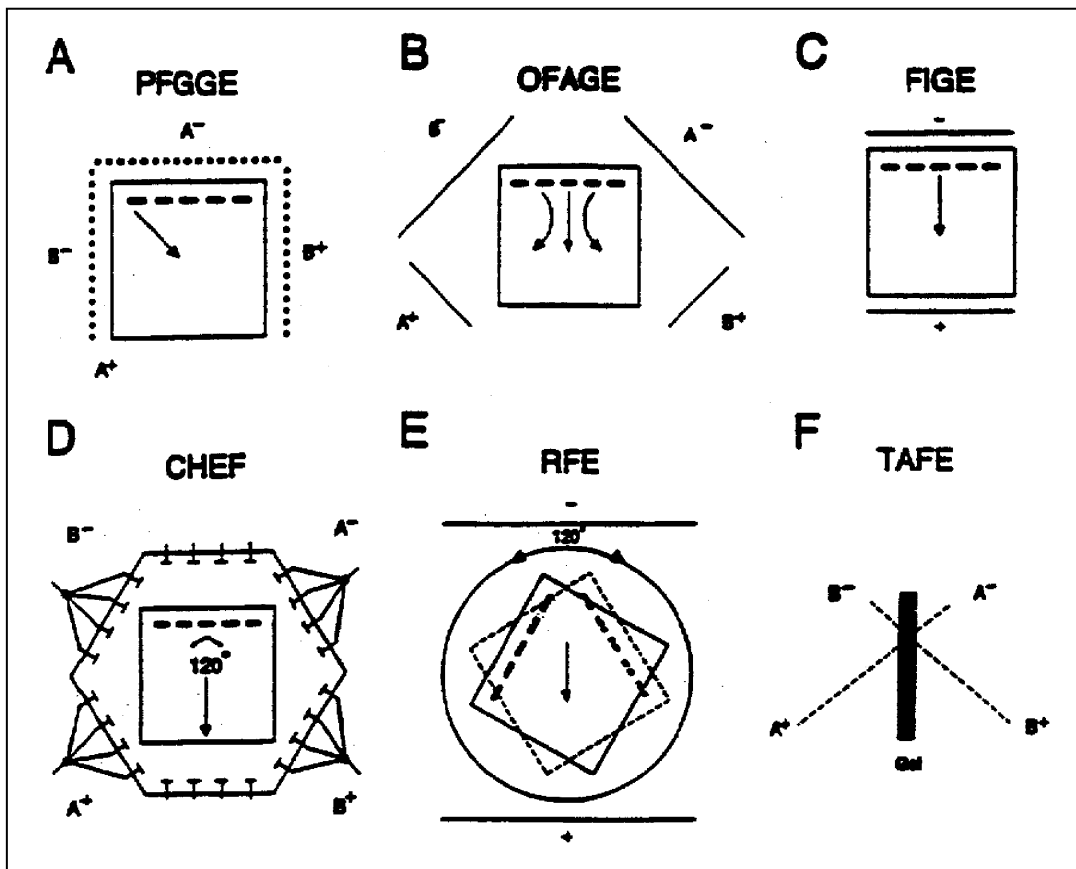


Figura 1.11 Esquema dels camps elèctrics en els principals sistemes d'electroforesi en camp polsant (De Den Dunnen i Van Ommen 1993).

Figure 1.11 Schematic drawing of electric fields in the several types of pulsed field gel electrophoresis. From Den Dunnen and Van Ommen 1993).

Electroforesi de camp rotatiu (RFE: Rotating field electrophoresis o també coneguda com

Crossed Field; Southern i col. 1987) en la que s'utilitzen elèctrodes que realitzen moviments rotatoris al voltant del gel (Fig. 1.11 E).

Electroforesi de camp alternant transversal (TAFE: Transverse alternating-field

electrophoresis; Gardiner i col. 1986). La disposició del gel és vertical i els parells d'elèctrodes es

munten paral·lels al pla del gel per les dues cares (Fig. 1.11 F).

En l'ús de la PFGE cal tenir en compte un seguit de paràmetres per tal d'obtenir una bona resolució del gel: paràmetres electroquímics (temps de pols, intensitat del camp, angle de camp i disseny de polsos), paràmetres del gel (material i la seva concentració en la matriu, concentració i composició del tampó, i temperatura a la que es realitza) i paràmetres del DNA com la topologia (Gemmill 1991). També s'han proposat diferents aproximacions teòriques que matemàticament intenten apropar-se als mecanismes moleculars (Noolandii 1992), sense que en l'actualitat cap dels models teòrics proposats expliqui acuradament les dades.

La PFGE ha contribuït a l'estudi de genomes, tant del món bacterià com d'organismes més complexes, per camins que abans no eren possibles. En un primer moment la PFGE va permetre una visió global dels genomes d'organismes unicel·lulars, mentre que en la seva aplicació en organismes eucariotes s'ha mostrat com una mena de pont que uneix la citogenètica i les tècniques de genètica molecular clàssica com ara la clonació i les anàlisis per hibridacions damunt membranes de nitrocel·lulosa.

En el camp de la genètica bacteriana s'han produït molts avenços amb l'aplicació de la PFGE, degut a que amb anterioritat a aquesta tècnica els estudis genòmics en el món procariòtic eren dependents de l'existència de les tres tècniques de genètica disponibles: la conjugació, la transformació i la transducció (tècniques que no eren disponibles per a tots els bacteris). Així doncs, els principals avantatges de les tècniques basades en la PFGE en l'estudi dels genomes bacterians rau en la independència de l'existència d'estudis genètics de base i d'altres eines com plasmidis, mutants i virus.

Topologia i nombre de cromosomes i plasmidis bacterians

El nombre, mida i topologia dels elements genètics són les primeres dades necessàries per tal de descriure un genoma bacterià. Cal fer esment que la tècnica de la PFGE ha fet possible canviar dogmes sobre l'estructura, nombre i topologia de cromosomes i plasmidis bacterians. Si bé es creia de manera generalitzada que els bacteris tenien un únic cromosoma circular, s'ha demostrat l'existència de cromosomes lineals en *Borrelia burgdorferi* (Baril i col. 1989) i en algunes espècies de *Streptomyces* (Lin i col. 1993). En el cas de *Rhodobacter sphaeroides* hi ha dos cromosomes circulars diferents de 3046 i 915 Kb (Swanto i Kaplan 1989), tot i que altres autors creuen que és un megaplasmidi (que per definició de plasmidi seria autònom i no essencial). Aquests elements genòmics es troben presents en una relació estequiomètrica de 1:1 i cap protocol dels provats aconsegueix "curar" d'aquesta macromolècula circular de 915 Kb on s'hi troba una seqüència codificadora per a rRNA i, per tant, essencial. També s'han proposat cromosomes addicionals en el cas de *Pseudomonas cepacia* (ara *Burkholderia cepacia*), i el seu genoma estaria format per 3 cromosomes de 3.400, 2500 i 900 Kb (Cheng i Lessie 1994).

En el cas dels plasmidis, s'han descrit també plasmidis lineals, com els de *Rhodococcus* (Masai i col. 1997, Pisabarro i col. 1998) i els de *Borrelia* (Zingg i col. 1993).

La PFGE permet que es posin de manifest els plasmidis ja que el DNA circular, superenrotllat o relaxat migra en el gel diferent que les molècules lineals, a taxes independents del pols de temps. La separació dels plasmidis s'aconsegueix en realitzar una electroforesi del bloc d'agarosa amb el DNA sense digerir. L'aplicació de polsos alts en l'electroforesi (100 segons) durant aproximadament 36 hores permet la migració dels plasmidis en el gel mentre que la resta de DNA queda retinguda en el pouet.

En el gènere *Pseudomonas*, la PFGE ha permès mostrar plasmidis grans que pertanyen als IncP2 que tenen una gran importància en ser alguns d'ells portadors de gens de resistència a antibiòtics i d'altres de gens de resistència a metalls pesants (Boronin 1992). D'aquesta manera poden posar-se de manifest megaplasmidis que a vegades esdevenen característiques específiques d'espècie. Un altre cas ha estat la separació de plasmidis (de 80 a 120 Kb) en algunes soques de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* i *P. syringae* pv. *maculicola* que produeixen la fitotoxina coronatina i, juntament amb proves d'hibridació, s'ha determinat la localització genòmica de l'agrupació dels gens en aquests plasmidis necessaris per sintetitzar-la, mentre que en algunes soques la localització és cromosòmica (Cuppels i Ainsworth 1995). En els estudis d'ecologia i estabilitat genètica de l'alliberament d'inòcul bacterià de *P. fluorescens* SBW25 modificat genèticament s'ha mostrat l'adquisició per part del bacteri alliberat de plasmidis que codifiquen per a resistència a mercuri, procedents de la microbiota indígena (Lilley i Bailey 1997a).

Per estimar la mida dels plasmidis circulars molt grans amb els protocols estàndards de la PFGE, donat que els plasmidis superenrotllats migren a taxes que no són solament funció del seu pes molecular, s'han proposat protocols que consisteixen amb un tractament previ amb la nucleasa S1 que el converteix en una molècula lineal (Barton i col. 1995).

Determinació de la mida genòmica

Fins a l'ús de la PFGE, s'utilitzaven cinètiques de renaturalització per esbrinar la mida genòmica. Aplicant la PFGE poden fer-se dues aproximacions diferents:

1) Sumatori dels fragments de macrorestricció

Després de tallar el DNA inclòs en el bloc d'agarosa amb enzims de restricció de tall poc freqüent, la mida s'estima gràcies a la suma de la mida dels fragments digerits per diferents enzims de restricció amb digestions individuals. Aquesta tècnica és més precisa que les aplicades fins aquest moment i, treballant amb la mateixa soca bacteriana pot donar resultats força diferents als obtinguts en les cinètiques de renaturalització.

A la taula 1.9 es mostren les mesures genòmiques calculades en el grup I rRNA del gènere *Pseudomonas*. La variació observada dins soques de la mateixa espècie com en el cas de *P. aeruginosa* i *P. stutzeri* pot ser el resultat de rearranjaments que involucrin deleccions, insercions o inversions. Exemples d'aquests rearranjaments estan descrits en bacteris entèrics i *Pseudomonas* spp., on elements transponibles, plasmidis integrats i profags poden facilitar-los.

Tot i que ha mostrat ser una tècnica precisa, una petita variabilitat en la mida estimada del genoma pot ser deguda a: (i) errors inherents en la mesura de la mida del fragment de DNA en la mobilitat del fragment en el gel respecte a la mobilitat dels patrons, (ii) fragments més petits de 8 Kb sovint no són detectats per la PFGE, però pot ser ignorada la font d'error en ser la seva contribució relativament insignificant, (iii) la presència de plasmidis sense talls dels enzims de restricció influeix en els càlculs degut a que la mobilitat del plasmidi no digerit no és la mateixa que en forma lineal, la qual cosa permet posar-lo de manifest, (iv) alguns investigadors (Lin i Johnson 1995) han observat que fragments superiors a 600 Kb presentaven sovint estequiòmicament una desproporció de fluorescència del bromur d'etidi i (v) l'existència de 2 o més fragments en una mateixa banda que pot resoldre's emprant mesures densitomètriques.

Taula 1.9 Mides genòmiques de soques de diferents espècies de *Pseudomonas* del grup I rRNA, calculades amb PFGE. Font: Bautsch i col. 1988, Grothues i Tümmler 1987, 1991, Römling i Tümmler 1991, Holloway i col. 1992, Rainey i Bailey 1996, Ginard i col. 1997.

Table 1.9 Size of the genome different *Pseudomonas* species (Group I rRNA) as determined by PFGE. From: Bautsch et al. 1988, Grothues and Tümmler 1987, 1991, Römling and Tümmler 1991, Holloway et al. 1992, Rainey and Bailey 1996, Ginard et al. 1997.

Espècie	Mida genòmica (Mb)
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1707	5.9
<i>P. aeruginosa</i> PAO	5.9
<i>P. aeruginosa</i> (18 soques diferents)	4.4 -5.4
<i>P. alcaligenes</i> DSM 50342	4.2
<i>P. aureofaciens</i> DSM 50082	5.0
<i>P. chlororaphis</i> DSM 50259	5.8
<i>P. cichorii</i> DSM 50259	5.4
<i>P. corrugata</i> NCPPB 2445	2.8
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	5.0
<i>P. fluorescens</i> SBW25	6.63
<i>P. marginalis</i> DSM 50275	4.5
<i>P. mendocina</i> DSM 50275	4.6
<i>P. pseudoalcaligenes</i> DSM 50188	4.2
<i>P. putida</i> DSM 50291	4.4
<i>P. putida</i> PPN	5.9
<i>P. stutzeri</i> DSM 50227	3.3
<i>P. stutzeri</i> (21 soques diferents)	3.8-4.6
<i>P. syringae</i> DSM 50302	3.8
<i>P. viridiflava</i> DSM 50337	4.0

Malgrat tot, hi ha també limitacions en l'ús d'aquestes tècniques i pot succeir que en alguns casos no sigui possible obtenir DNA de qualitat satisfactòria, com en el cas de *Clostridium sporogenes* PA3676 (Lin i Johnson 1995) que segons els investigadors podria ser causat per una alta activitat DNAsa en aquest organisme. En el cas d'*Erwinia amylovora* s'han utilitzat diferents tampons als

habituals ja que s'obtenia DNA degradat, presumptament degut a l'activació de nucleases endògenes per part d'alguns tampons (Zhang i Geider 1997).

Actualment, per estimar la mida genòmica s'utilitzen enzims de restricció que tallen el genoma en molt poques bandes, com per exemple I-Ceu que és codificat per un intró mòbil del grup I del cloroplast del gen ribosomal 23S de *Chlamydomonas eugametos*. Aquest enzim ha estat utilitzat en soques de *Pseudomonas stutzeri* (Ginard i col. 1997).

2) Linearització del cromosoma

Sovint, quan tenim el DNA inclòs en el bloc d'agarosa, es pot produir una linearització (també es pot provocar aquesta irradiant amb raigs γ o tallant molt poca estona amb 0.001-0.1 U d'enzim). Amb electroforesis d'una setmana de duració pot arribar a veure's una banda que correspon al cromosoma linearitzat. Sol utilitzar-se aquesta aproximació per acabar de comprovar si el resultat obtingut amb el sumatori dels fragments generats en la digestió coincideix amb la totalitat del genoma, com s'ha fet en el cas de les soques de *P. stutzeri* (Ginard i col. 1997).

Construcció de mapes físics i genètics

Quan el nombre d'elements genètics és conegut, pot portar-se a terme la construcció de mapes. Els mapes físics especifiquen la distància entre senyals al llarg del cromosoma i els senyals més importants en aquests mapes són les dianes de restricció resultants de la digestió del genoma amb els enzims corresponents. Hi ha dues aproximacions globals per realitzar mapes físics a gran escala, una aproximació ascendent i una aproximació descendent :

Sistema ascendent. Es basa en la fragmentació i clonatge del genoma en plasmidis o còsmids dins un bacteri i en la posterior identificació dels clons portadors dels fragments solapants. Es l'anomenat "chromosome walking". Els mapes obtinguts amb aquest sistema tenen alta resolució, però també poden presentar inconvenients si en el genoma hi ha, per exemple, excessives seqüències repetides.

Sistema descendent. S'elabora un mapa físic amb l'ajut d'enzims de restricció de tall poc freqüent i se separen els fragments amb la tècnica de la PFGE. Aquest mapa complet pot tenir en un primer moment una baixa resolució que pot anar incrementant-se posteriorment; l'avantatge més notable respecte al sistema ascendent rau en la seva rapidesa.

La construcció dels mapes físics amb el sistema descendent que emprava la tècnica de la PFGE, sol ser sempre una primera aproximació a l'estructura global del genoma, però normalment a partir d'aquesta base pot incrementar-se la seva resolució. En *Pseudomonas* s'han realitzat els mapes físics de *P. aeruginosa* PAO (Römling i col. 1989), el primer mapa

físic de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (De Ita i col. 1998) i de *P. fluorescens* SBW25 (Rainey i Bailey 1996)

A partir del mapa físic es pot construir el mapa genètic, quan mitjançant tècniques d'hibridació es van situant diferents gens. Cada vegada més, degut als problemes inherents a les anàlisis d'hibridació, s'utilitzen tècniques de PFGE en dues dimensions. Una PFGE en dues dimensions es basa en la separació d'una restricció parcial en una primera dimensió, i posterior redigestió completa i resolta electroforèticament en la segona dimensió perpendicularment. Hi ha diferents aproximacions per obtenir mapes amb la tècnica de la PFGE, per simple i doble restricció, amb marcatge indirecte dels finals, per hibridació creuada, amb digestions parcials, etc. (Cole i Saint Girons 1994, Römling i Tümmler 1994). A la taula 1.10 s'indiquen els mapes físics on s'han localitzat determinats gens de membres de grup *Pseudomonas*.

Taula 1.10 Mapes genètics descrits en el gènere *Pseudomonas*.

Table 1.10. Genetic maps available for species of the genus *Pseudomonas*.

<i>Pseudomonas</i>	Referències
<i>P. stutzeri</i> (els diferents genomovars)	Ginard i col. 1997
<i>P. aeruginosa</i>	Holloway i col. 1992
<i>P. aeruginosa</i> PAO	Ratnaningsih i col. 1990, Holloway i col. 1986, Liao i col. 1996
<i>P. putida</i> PNN	Holloway i col. 1986
<i>P. solanacearum</i>	Holloway i col. 1992
<i>P. fluorescens</i> SBW25	Rainey i Bailey 1996

Anàlisis comparatives dels patrons de restricció cromosòmics mitjançant PFGE

L'anàlisi dels patrons de restricció del genoma bacterià es feia antigament emprant enzims de tall freqüent, resolent els fragments en gels d'agarosa, seguit de proves d'hibridació (com per exemple hibridació dels gens ribosomals, anomenant-se ribotipat). D'aquesta manera la part del genoma analitzat era molt petita en comparació a la seva totalitat. La tècnica de la PFGE permet fer estudis comparatius dels fragments de macrorestricció portats a terme amb l'anàlisi del genoma sencer o bé solament amb una part del genoma. Dependrà en últim terme del tipus d'estudi a realitzar, dels bacteris que volem estudiar i de les metodologies d'estudi de què es disposa.

Per l'aplicació de la tècnica en la taxonomia del grup de *Pseudomonas*, Grothues i Tümmler al 1991 van desenvolupar un mètode general d'anàlisi quantitativa utilitzant algorismes per avaluar els patrons de fragments de macrorestricció com a eina per a la identificació i classificació en gènere, espècie i subespècie. Van emprar 235 soques de *Pseudomonas* agrupades en 32 espècies diferents i utilitzant les dades obtingudes en la digestió del genoma amb 5 enzims de

restricció diferents. Els resultats obtinguts confirmaven en general la classificació basada en les propietats fenotípiques i en experiments d'hibridació d'àcids nucleics. Si bé dins els diferents grups d'homologia de rRNA les dades es corresponien força als grups taxonòmics establerts, en els grups d'homologia III, IV i V les espècies es barrejaven. La majoria de soques del grup I rRNA es trobaven en una agrupació (a excepció de *P. aeruginosa*) que estava dividida en dues subagrupacions, fluorescents i no fluorescents. Dins les fluorescents existia una nova subdivisió entre els bacteris fitopatògens i els no fitopatògens (a excepció de la soca tipus *P. fluorescens* ATCC 13525 que es trobava agrupada junt amb les soques fitopatògenes).

En altres casos l'estudi taxonòmic ha estat realitzat dins una sola espècie, com en el cas de *Streptococcus dysgalactiae*. Els resultats d'aquest estudi han mostrat que les soques patògenes d'animals i d'humans s'agrupen en dos grups diferenciats i s'ha proposat la creació de dues subespècies a nivell taxonòmic (Bert i col. 1997)

Quan la comparació dels patrons de restricció s'ha realitzat a nivell d'interespècies s'han obtingut bons resultats en el cas del gènere *Listeria*, *Bordetella* i *Xanthomonas* (Howard i col. 1992, Khattak i Matthews 1993, Chan i Goodwin 1999). Quant a l'estudi del polimorfisme en soques fitopatògenes pertanyents a diferents espècies i patovars de *Pseudomonas* els patrons obtinguts van mostrar la capacitat de diferenciació de soques de la mateixa espècie o patovar observant-se una gran similitud en els patrons quan les soques provenien de la mateixa font, tot i que en alguns casos soques del mateix patovar i de diferent origen compartien el mateix patró. L'estudi va permetre diferenciar varies espècies, patovars i inclusivament diferents soques dins el mateix patovar del grup de les pseudomonas fitopatògenes (Grothues i Rudolph 1991).

L'anàlisi dels patrons de macrorestricció ha esdevingut una eina de gran valor en el camp de l'epidemiologia tal com mostren els treballs realitzats en bacteris patògens. En *Xanthomonas albilineans*, van estudiar-se 218 soques de 31 localitats diferents que van mostrar un alt polimorfisme. Posteriorment, els resultats obtinguts van permetre realitzar estudis epidemiològics donat que la distribució espacial i temporal de dues variants va suggerir la variant causal del brot (Davis i col. 1997). En altres patògens, com en el cas d'*Erwinia amylovora*, l'ús de la tècnica ha permès agrupar les soques segons la procedència geogràfica de l'aïllat i, per tant, esdevé una eina important per seguir els curs de la distribució de la malaltia i les vies de transmissió (Zhang i col. 1996, Zhang i Geider 1997, Bazzi i col. 1999).

L'anàlisi dels perfils genòmics obtinguts per PFGE és també una eina útil i poderosa a l'hora de fer la diferenciació a nivell de soques bacterianes (Lin i Johnson 1995, Tanskanen i col. 1990, Kelly i col. 1993, Frey i col. 1996) i la construcció d'arbres filogenètics (Rodrigo i col. 1994, Desai i col. 1998).

Altres aplicacions de la PFGE han estat la clonació de fragments grans de DNA en organismes procariotes, l'estimació de mides genòmiques de fags (Campbell i col. 1995a), cariotipat de fongs, llevats i ciliats (Waltz 1995, Versavaud i col. 1995, Martín i col. 1997), així com en tots aquells treballs on la mida de les molècules de DNA amb les que es treballa sobrepassen la mida adequada per resoldre els fragments en gels d'electroforesis convencionals (Roder i col. 1992).

1.4 Objectius generals

La cerca d'agents de biocontrol començada pel grup de recerca ara fa 10 anys, ha permès disposar d'una nombrosa col·lecció d'aïllats que pertanyen als gèneres *Pseudomonas* i *Erwinia*. En el present treball, es va realitzar una selecció de soques de *Pseudomonas*, que juntament amb els aïllats obtinguts en el treball, han de permetre una anàlisi polifàsica amb l'estudi de diferents característiques fenotípiques i genotípiques de les soques per avaluar si existeixen relacions entre aquestes i la seva actuació com a agents de biocontrol en les malalties citades en aquest apartat o com a promotors del creixement en portaempelts de fruiters.

L'objectiu general que ens hem plantejat en aquesta tesi ha estat la cerca de marcadors fenotípics i moleculars mitjançant l'anàlisi polifàsica d'un conjunt de soques de *Pseudomonas fluorescens* potencials agents de biocontrol de malalties dels fruiters i/o promotores del creixement.

Els objectius concrets han estat:

- 1- Selecció d'agents de biocontrol mitjançant l'ús de marcadors moleculars
- 2- Caracterització fenotípica d'una selecció d'aïllats
- 3- Caracterització genotípica del grup d'aïllats seleccionat.
- 4- Anàlisi polifàsica d'un grup d'aïllats seleccionat

1.1 El control biològic i els sistemes tradicionals de control de les malalties de les plantes.....	1
1.1.1 Els sistemes tradicionals de control.....	1
1.1.2 Problemàtica del control de malalties d'importància econòmica en producció i postcollita dels fruiters.....	3
1.1.3 El control biològic com a alternativa.....	6
1.1.3.1 Mecanismes d'acció dels agents de biocontrol.....	8
1.1.3.2 Mètodes de prospecció d'agents de biocontrol.....	15
1.1.3.3 Factors que afecten l'eficàcia dels processos de biocontrol.....	18
1.1.3.4 Seguiment i traçabilitat dels agents de biocontrol.....	21
1.2 El gènere <i>Pseudomonas</i> com a font d'agents de biocontrol.....	25
1.2.1 El gènere <i>Pseudomonas</i> i l'espècie <i>P. fluorescens</i>	25
1.2.2 Estat actual del biocontrol de malalties amb bacteris del gènere <i>Pseudomonas</i>	31
1.2.3 L'antibiosi com a mecanisme de biocontrol.....	34
1.2.3.1 Metabòlits produïts per <i>Pseudomonas</i>	34
1.2.3.2 Regulació i anàlisi genètica de la producció d'antibiòtics en <i>Pseudomonas</i>	37
1.3 La recerca de marcadors fenotípics i genotípics específics relacionats amb la capacitat de biocontrol en soques de <i>Pseudomonas</i>.....	41
1.3.1 La caracterització genòmica. Aplicació a l'estudi de bacteris actius en el control biològic de malalties.....	43
1.3.1.1 Mètodes dependents de l'amplificació per PCR.....	47
1.3.1.2 Mètodes independents de l'amplificació per PCR.....	52
1.3.2 Caracterització subespecífica de bacteris mitjançant el polimorfisme dels fragments de macrorestricció genòmica del DNA.....	52
1.4 Objectius generals.....	61

Capítol 2:
Selecció assistida d'agents
de biocontrol mitjançant
l'ús de marcadors moleculars

2.1 Introducció

2.1.1 Aïllament i prospecció de bacteris candidats a ACBs

El mètode de prospecció d'ACBs més utilitzat fins ara ha estat basat en l'obtenció d'un gran nombre d'aïllats i una primera selecció dels que mostren antagonisme *in vitro*. Posteriorment es passa a una segona fase de selecció mitjançant la realització de bioassaigs en material vegetal, és a dir, *in planta* en ambient controlat. Però, diversos treballs han mostrat una baixa o inexistent correlació entre l'antagonisme *in vitro* i el biocontrol *in planta* (Yuen i col. 1994, Bonaterra 1997, Landa i col. 2001). Aquesta manca de correlació afegida al coneixement de que l'eficàcia del biocontrol està fortament influenciada per les interaccions que s'estableixen entre els factors biòtics i abiòtics d'un patosistema, fa que actualment sigui preferible fer la selecció directament en planta. Malauradament però, els mètodes que impliquen una selecció en planta són poc viables tant pel que fa referència a l'economia com a la inversió de temps i feina que s'ha de realitzar quan es treballa amb un alt nombre d'aïllats. Per solucionar aquest problema, una nova estratègia que sembla adquirir impuls en els darrers anys és la recerca d'ACBs a partir d'extractes crus obtinguts de tota la microbiota de la planta (és a dir, sense purificació prèvia) que han mostrat prèviament bons resultats en bioassaigs en porcions de teixits o òrgans vegetals. A partir d'aquests extractes actius es procedeix a l'aïllament dels diferents microorganismes i a l'assaig individualitzat de cada un d'ells com a ACBs (Schisler i Slininger 1997, Vázquez 1998). L'avantatge d'aquesta estratègia rau en que les condicions són més semblants al que succeeix en la planta i, alhora, no són tant complexes de portar a terme com una primera selecció a partir d'assaigs en planta sencera. N'obstant, l'estratègia proposada per Andrews (1992) d'una primera selecció dels ACBs a partir de la realització simultània d'assaigs *in vitro* i bioassaigs *in vivo* en ambient controlat és, ara per ara, un dels mètodes que tenen en compte els diferents mecanismes de biocontrol, al passar aquesta primera selecció tant els antagonistes en ambdós casos com en solament un d'ells.

Un cop aïllat, identificat i caracteritzat el microorganisme candidat a agent de biocontrol, es procedeix a l'estudi dels mecanismes implicats, incloent l'avaluació d'un conjunt de trets com la producció de substàncies antibiòtiques, d'enzims i altres metabòlits com cianhídric i la possible competència pel nínxol ecològic o nutrients. Per tots aquests motius, la recerca, caracterització i assaigs d'eficàcia sol comportar un període llarg de temps fins a l'obtenció de resultats.

Si bé cada vegada més s'està interessat en la recerca d'ACBs que actuïn amb mecanismes diferents de l'antibiosi, en la majoria de sistemes eficaços de biocontrol s'ha observat que la producció d'antibiòtics és un dels mecanismes més importants. Entre aquests antibiòtics produïts

principalment per soques de *Pseudomonas* spp. cal destacar els floroglucinols, fenazines i pirrols. Les tècniques de biologia molecular disponibles actualment fan que sigui possible l'ús de determinats marcadors moleculars en l'avaluació de microorganismes possibles productors d'aquests antibiòtics.

2.1.2 Aplicació de la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) en la recerca de soques de *Pseudomonas* productores dels antibiòtics 2,4-diacetilfloroglucinol, àcid fenazin-1-carboxílic i pirrolnitrina

En els darrers anys, l'ús de les tècniques de detecció i identificació de microorganismes basades en el DNA ha sofert un gran augment al solucionar, sobretot, els inconvenients de les tècniques microbiològiques clàssiques pel que fa referència al temps necessari per a l'obtenció dels resultats i a la necessitat de realitzar cultius. Si bé en el camp de la Patologia Vegetal aquests avenços són àmpliament emprats en la identificació de patògens, ha calgut el coneixement aconseguit en els darrers anys dels gens necessaris per la síntesi dels antibiòtics implicats en el biocontrol, per a l'aplicació d'aquestes tècniques en microorganismes beneficiosos per a les plantes. A la taula 2.1 es mostra una relació dels gens biosintètics de diversos antibiòtics amb el número d'accés a les seqüències dipositades al GenBank presents en diverses espècies i soques de *Pseudomonas*.

Taula 2.1 Número d'accés al GenBank dels gens per a la producció d'antibiòtics produïts per *Pseudomonas*. Pirrolnitrina (Prn), 2,4-diacetilfloroglucinol (Phl), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) i pioluteorina (Plt).

Table 2.1 Accession number in GenBank of genes for antibiotic production by *Pseudomonas*. Pyrrolnitrin (Prn), 2,4-diacetylploroglucinol (Phl), phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and pyoluteorin (Plt).

Metabòlit / GenBank nº	Soca	Referència
Prn / U74493	<i>P. fluorescens</i> BL915	Hammer i col. 1997
Phl / U41818	<i>P. fluorescens</i> Q ₂ -87	Bangera i col. 1996
PCA / L48616	<i>P. aureofaciens</i> 30-84	Pierson III i col. 1995
Plt / AF081920	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	Nowak-Thompson i col. 1997

La disponibilitat de les seqüències dels gens biosintètics de la producció d'antibiòtics ha permès el desenvolupament d'encebadors per ser emprats en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) així com el disseny de sondes que poden emprar-se per a la detecció de *Pseudomonas* que siguin portadors d'aquests gens. Aquesta tècnica ha de permetre la selecció de soques aïllades en els diferents sistemes on vol aplicar-se el biocontrol i cal esperar que estiguin més ben adaptades a les condicions del lloc on es volen emprar. Paral·lelament, la seqüenciació ha permès l'estudi de les possibles rutes de síntesi dels diferents antibiòtics (Pierson III i col. 1998, Nowak-Thompson i col. 1999, Bangera i Thomashow 1999, Kirner i col. 1998).

L'ús de les tècniques moleculars és important perquè l'expressió dels gens biosintètics de la producció d'antibiòtics està afectada per factors ambientals (composició del medi, temperatura, pH, etc.), i l'efecte d'algun dels factors depèn de la soca mentre que d'altres afecten de manera igual a

totes les soques (Duffy i Défago 1999, Alemany 2001). Per tant, l'avantatge de l'ús d'aquestes tècniques rau en que no és necessària l'expressió dels gens implicats sinó solament la seva presència. Raaijmakers i col. (1997) van dissenyar encebadors per a la detecció dels gens biosintètics de PCA i PhI. L'ús dels encebadors i de les sondes corresponents als gens amplificats ha estat des d'aleshores emprat en treballs que han permès relacionar la freqüència de *Pseudomonas* productores de PhI en sòls amb la supressió del "Take-all" del blat (Raaijmakers i Weller 1998), l'efecte del nivell poblacional d'aïllats productors en la quantitat d'antibiòtic produït (Raaijmakers i col. 1999a, 1999b, Raaijmakers i Weller 2001) i l'estudi de la diversitat fenotípica i genotípica de soques que contenen el gen en un camp de blat (McSpadden i col. 2000, 2001).

Un altre dels objectius que hom es pot proposar emprant aquests encebadors és la realització de una selecció assistida d'aïllats amb aquests marcadors moleculars que siguin portadors dels gens biosintètics de cada un dels antibiòtics.

2.1.3 Principals antibiòtics d'interès en el biocontrol

D'entre la gran diversitat de metabòlits sintetitzats per *Pseudomonas* spp. cal destacar alguns antibiòtics que han estat implicats en processos de biocontrol. Els tres antibiòtics més importants que s'han descrit fins ara són dels grups dels floroglucinols, fenazines i pirrols.

Floroglucinols

Els antibiòtics del grup dels floroglucinols són metabòlits fenòlics amb propietats antivirals, antifúngiques, antihelmíntiques i fitotòxiques. La producció de floroglucinols ha estat descrita tant en bacteris com en plantes (Fujimoto i col. 1995, Levy i Carmeli 1995). Dins el floroglucinols, el 2-4-diacetilfloroglucinol (DAPG o PhI) ha estat el que s'ha relacionat amb el control biològic d'algunes soques de *Pseudomonas*, ja sigui com a únic metabòlit o en altres casos com a un dels metabòlits implicats en el biocontrol. Entre aquestes soques productores cal citar les soques *P. fluorescens* CHA0 (Défago i Haas 1990, Laville i col. 1992), *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ (Shanahan i col. 1992), *P. fluorescens* Pf-5 (Nowak-Thompson i col. 1994) i *P. fluorescens* F113 (Fenton i col. 1992). També han estat descrites altres espècies com *P. aurantiaca* (Garagulya i col. 1974) i la soca 3-45 del gènere *Enterobacter* (Picard i col. 2000).

Fenazines

Els antibiòtics del grup de les fenazines són pigmentats i contenen compostos heterocíclics de nitrogen. La producció de fenazines ha estat descrita en molts procarotes com *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Microbispora*, *Brevibacterium*, *Sorangium* i *Pseudomonas* (Leisinger i Margraff 1979). Entre els diferents compostos derivats de les fenazines es pot citar com a més important l'àcid fenazin-1-carboxílic (PCA), i si bé encara no s'ha determinat la ruta metabòlica de biosíntesi, sembla que entre els compostos intermedis es troba la clororanfina i l'

oxiclororafina, i en el cas de la producció de la fenazin-1- carboximida, el PCA actua com a precursor. En aquest cas, les soques productores de PCA i en les que la producció és un dels principals mecanismes de biocontrol, són bàsicament *P. fluorescens* 2-79 i *P. aureofaciens* 30-84 (Tomashow i Weller 1988, Vincent i col. 1991, Timms-Wilson i col. 2000).

Pirrols

Entre els antibiòtics de la família dels fenilpirrols clorats, cal destacar la pirrolnitrina (Prn) i la pioluteorina (Plt). La pirrolnitrina és el compost més actiu i, si bé s'ha determinat que la seva síntesi parteix del triptòfan, no es coneixen els detalls de la ruta metabòlica. La producció de pirrolnitrina va estar descrita per primer cop en *Pseudomonas pyrocinia* (Arima i col. 1964) i actualment s'ha descrit en diferents soques de *P. fluorescens*, *Burkholderia cepacia* i també en *Coralloccoccus*, *Cystobacter*, *Serratia*, *Myxococcus* i *Enterobacter agglomerans* (El-Banna i Winkelmann 1998, Hammer i col. 1999). Entre les soques actives en biocontrol productores de pirrolnitrina cal citar *P. fluorescens* CHA0 (Duffy i Défago 1999), *P. fluorescens* Pf-5 (Pfender i col. 1993) i *P. fluorescens* BL915 (Hammer i col. 1997).

2.1.4 Objectius

L'objectiu d'aquest capítol ha estat la selecció assistida de candidats a ACBs mitjançant marcadors moleculars de producció d'antibiòtics. Per assolir aquest objectiu ha estat necessari:

- 1- Aïllar bacteris epífits del grup fluorescent de *Pseudomonas* a partir de diversos ambients i de diferents espècies i òrgans de plantes hoste.
- 2- Dissenyar encebadors per a la detecció de gens biosintètics de la Pirrolnitrina (Prn).
- 3- Seleccionar aïllats portadors dels gens biosintètics dels antibiòtics PhI, PCA i Prn, mitjançant marcadors moleculars amplificats amb l'ús de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).
- 4- Avaluar diferents estratègies de detecció d'aïllats portadors dels gens dels antibiòtics, utilitzant com a sistemes model els antibiòtics foroglucinol i l'àcid fenazin-1-carboxílic.

2.2 Material i mètodes

2.2.1 Aïllament de bacteris epífits

Amb la finalitat d'aïllar bacteris epífits que pertanyessin al grup fluorescent de *Pseudomonas* i mercès a la tasca de diversos investigadors del grup de recerca de Patologia de la Producció i Postcollita de Fruita de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA) de la Universitat de Girona, es van recollir 450 mostres vegetals. Aquestes procedien sobretot de la part aèria i sistema radical de plantes de vivers, plantacions comercials de fruiters i de camps cultivats en el període comprès entre els anys 1998-2000.

Un cop recollides les mostres, es van mantenir a 4 °C fins el moment de realitzar l'extracció. En el cas de les mostres procedents de la part aèria, es van pesar de 5 a 10 g de material vegetal i es van homogeneïtzar en una bossa de plàstic amb 50 mL de tampó d'extracció 1 amb un homogeneïtzador de pales durant 1 min. Quan les mostres provenien d'arrels, aquestes es rentaven en aigua estèril per treure les partícules de sòl més grolleres, es pesaven aproximadament 2 g i es procedia com en l'apartat anterior. En el cas dels sòls es va pesar 1 g i, a diferència dels anteriors, es van agitar amb un agitador orbital durant 20 min a 150 rpm.

A fi d'obtenir colònies separades es van sembrar en superfície en agar B de King (KB) les dilucions adequades dels extractes obtinguts. Després de la incubació a 22 °C durant 24-48 h es procedia a l'aïllament de colònies fluorescents observant les plaques amb llum ultraviolada de 340 nm. Un cop obtinguts cultius purs dels diferents aïllats es van realitzar les proves d'oxidasa i el Gram, seleccionant els aïllats Gram negatius i oxidasa positius, pertanyents a *Pseudomonas* (sensu stricto). Els aïllats es varen conservar glicerats al 20 % a -80 °C.

Els reactius, aparells, tampons i medis de cultiu utilitzats així com les proves bioquímiques i les tincions es descriuen a l'annex 2.

2.2.2 Disseny d'encebadors per a la detecció de gens biosintètics de la pirrolnitrina (Prn)

A partir de la seqüència de la Prn dipositada en el GenBank (nº d'accés U74493), es va escollir el fragment que es troba situat entre els 4895 i 5986 pb de la seqüència, que correspon al gen *prnD*. Aquest fragment sembla que codifica per una aminopirrolnitrina oxidasa que catalitza l'oxidació del grup amino de l'aminopirrolnitrina a un grup nitro per formar pirrolnitrina. Es va seleccionar aquest

fragment al ser el del gen que codifica per l'últim enzim implicat en l'obtenció de la pirrolnitrina. El criteri utilitzat per a la selecció dels encebadors va ser:

- a) que la temperatura d'anellament dels encebadors fos la mateixa que pels encebadors existents de la PhI i PCA. D'aquesta manera, es podrien realitzar les amplificacions dels aïllats en el mateix programa de PCR.
- b) que la mida del fragment amplificat fos similar a la de PhI i PCA i així el gel per a la visualització dels resultats seria també adient pels tres.

Pel disseny dels encebadors a partir del fragment seleccionat de DNA es va utilitzar el programa SEQAID (Rhoads, D.D. i Roufa, D.J.; Kansas State University, Molecular Genetics Laboratory). Un cop obtinguts els iniciadors que complien aquests dos requisits, es van sotmetre a una cerca pel programa BLAST (Altschul i col. 1997) per tal d'avaluar altres seqüències dipositades en el GenBank que fossin dianes d'aquests encebadors.

2.2.3 Detecció de la presència dels gens biosintètics dels antibiòtics 2,4-diacetilfloroglucinol (PhI), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) i pirrolnitrina (Prn) en aïllats de *Pseudomonas* (*sensu stricto*)

2.2.3.1 Soques utilitzades

Es van emprar les soques del socari de l'INTEA relacionades a l'Annex 1, els aïllats citats a l'apartat 2.2.1, les soques cedides per altres investigadors i soques tipus (Taules 2.2 i 2.3)

Taula 2.2 Soques de *P. fluorescens* de referència.
Table 2.2 *P. fluorescens* reference strains.

Codi de la soca	Col·lecció de procedència	Codi de referència de l'ATCC	Biovar
378	CECT	13525	I (Soca tipus de <i>P. fluorescens</i>)
844	CECT	13430	I
2126	CFBP	17816	II
2128	CFBP	17559	III
2129	CFBP	17513	IV
2131	CFBP	17518	V

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Espanya; CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md. U.S.A.

Taula 2.3 Soques de *Pseudomonas*, cedides per altres investigadors, que han estat utilitzades en aquest treball.

Table 2.3 *Pseudomonas* strains provided by other researchers which were used in this work.

Soca	Metabòlits identificats	Investigador (Empresa o centre, país)
<i>P. fluorescens</i> BL915	Prn, HCN, quitinases	Steve Hill (Novartis Crop Protection, Inc. Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A.)
<i>P. fluorescens</i> CHA0	PhI, Plt, Prn, HCN, IAA, àcid salicílic, quitinases	Gènieve Défago (Institute of Plant Sciences/Phytopathology, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland)
<i>Pseudomonas</i> sp. JBR1-70	PhI	Jos J. Raaijmakers (Laboratory for Phytopathology, Wageningen Agricultural University, The Netherlands)
<i>Pseudomonas</i> sp. JMP12-84	PhI	
<i>P. fluorescens</i> Ps15	PhI	Mette Neiendam Nielsen (Departement of Ecology and Molecular Biology. Section of Genetics and Microbiology, Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark)
<i>P. fluorescens</i> Ps31	PhI	
<i>Pseudomonas</i> sp. WB1	àcid salicílic, HCN	Walid Fakhouri (Universität Hohenheim, Institut für Phytomedizin, Stuttgart, Germany)
<i>Pseudomonas</i> sp. WB52	àcid salicílic, HCN	
<i>P. fluorescens</i> SBW25	-	Mark J. Bailey (Molecular Microbial Ecology, Institute of Virology and Environmental Microbiology, Oxford, England)
<i>P. fluorescens</i> Q ₂₋₈₇	PhI, HCN	Linda Thomashow (U.S. Department of Agricultural Research Service, Root Disease and Biological Control Reserch Unit, Washington State University, U.S.A.)
<i>P. fluorescens</i> Q ₄₋₈₇	PhI, HCN	
<i>P. fluorescens</i> Q69c-80	HCN	
<i>P. fluorescens</i> M _{480-R}	-	
<i>P. fluorescens</i> 2-79	PCA	

PhI, 2,4-diacetilfloroglucinol; PCA, àcid fenazin-1-carboxílic; Prn, Pirrolnitrina; IAA, àcid-3-indolacètic; HCN, cianhídric
 PhI, 2,4-diacetylphloroglucinol; PCA, phenazine-1-carboxylic acid; Prn, Pyrrolnitrin; IAA, Indole-3-acetic acid; HCN, hydrogen cyanide

2.2.3.2 Detecció per PCR dels gens biosintètics de PhI, PCA i Prn

Per a la detecció de la presència de gens biosintètics es va seguir el protocol descrit per Raaijmakers i col. (1997) amb els aïllats en cultiu pur, i que es descriu a continuació.

a) Obtenció de DNA

Els aïllats bacterians es van repicar en plaques de KB o LB, escollint el medi LB per aquells que en KB produïen abundants exopolisacàrids. Després d'un període d'incubació de 48 h a 25 °C, s'homogeneïtzaven dues colònies d'aproximadament 2 mm de diàmetre en 100 µL de Tampó de lisi 1 en un microtub amb l'ajut d'un escuradents estèril. Després d'una incubació a 100 °C durant 15 min se centrifugaven a 12.000 g durant 1 min. Finalment es procedia a diluir 50 vegades el sobrenedant en aigua destil·lada (6 µL de sobrenedant en 294 µL d'aigua estèril). Aquesta dilució es va emprar com a mostra per fer la PCR o es va guardar congelada a -20 °C fins al moment del seu ús. En cada una de les extraccions es va introduir com a control positiu una soca que contenia el gen d'interès i una soca que no el contenia com a control negatiu (Taula 2.4).

Taula 2.4 Soques emprades com a control positiu i negatiu de la presència dels gens necessaris per la producció de PCA, PhI i Prn en cada una de les extraccions de DNA.

Table 2.4 Strains used as positive and negative controls which harbor the genes necessary for production of PhI, PCA and Prn in each DNA extraction.

Gen	Control	Soca	Ref.
<i>phlD</i>	+	<i>P fluorescens</i> Q ₂ 87	Bangera i Thomashow 1996
<i>phzC-phzD</i>	+	<i>P fluorescens</i> 2-79	Thomashow i col. 1990
<i>prnD</i>	+	<i>P fluorescens</i> BL915	Hammer i col. 1997
<i>phlD, phzC-phzD, prnD</i>	-	<i>P fluorescens</i> SBW25	Rayney i Bailey 1996

b) Amplificació dels gens d'interès

b₁) Encebadors

Els encebadors utilitzats per amplificar els gens implicats en la biosíntesi de Phl, PCA (Raaijmakers i col. 1997) i Prn (aquests treball) es mostren a la taula 2.5

Taula 2.5 Característiques dels encebadors emprats.

Table 2.5 Primers used for PCR analysis.

Encebador	Seqüència 5' → 3'	G+C %	Temperatura (°C)	Posició ^a (pb)	Referència
Phl2a	GAGGACGTCGAAGACCACCA	60	73	1915	Raaijmakers i col. 1997
Phl2b	ACCGCAGCATCGTGTATGAG	55	72	2660	Raaijmakers i col. 1997
PCA2a	TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC	60	79	3191	Raaijmakers i col. 1997
PCA3b	CCGCGTTGTTCCCTCGTTCAT	55	76	4341	Raaijmakers i col. 1997
Prna	TCAAGGACAAGCCGACCGAGT	57	68.1	5007	Aquest treball
Prnb	GCAGCCCGAACAGCACGAAGT	61	69.1	5837	Aquest treball

^a posició de l'extrem 5' de l'encebador de la seqüència dipositada del GenBank. La mida dels fragments amplificats amb els encebadors: Phl, 745 pb; PCA, 1150 pb; i Prn, 830 pb.

^a position of the 5' end of the primer in the database sequence. Size of fragments amplified by primers: Phl, 745 pb; PCA, 1150 pb; and Prn, 830 pb.

b₂) Amplificació

L'amplificació es va portar a terme en un volum final de reacció de 25 µL en microtubs de polipropilè de 200 µL de paret fina que contenen 200 µM de dNTPs, 10 pmols de cada encebador, 2U de Taq polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂ en el tampó corresponent de la Taq polimerasa utilitzada. Es van emprar 5 µL de mostra per a cada reacció.

El procediment es realitza preparant un microtub mare de reacció en una cabina neta per PCR emprant pipetes de desplaçament positiu, amb tots els components (a excepció de la mostra) de la totalitat del nombre de mostres que es volen realitzar (s'afegeix un volum de més per compensar la pèrdua de volum en el repartiment posterior) i es reparteixen 20 µL de la barreja en cada un dels microtubs. Un cop al·lotats, es realitza l'addició de la mostra a l'exterior de la campana. Pel que fa referència al termociclador, es va separar físicament del laboratori de treball per evitar les contaminacions que es poguessin produir en la manipulació dels amplificats. En el transcurs del treball es van emprar diferents marques comercials de Taq polimerasa (annex 2). A

continuació es mostra com a exemple els volums dels diferents components en el cas de la Taq polimerasa de Cultex:

Component	µL/tub de reacció
H ₂ O Milli-Q estèril	11.75
Tampó (10x)	2.5
MgCl ₂ (50mM)	0.75
DNTPs (2mM)	2.5
Encebador 1 (10pm/µL)	1
Encebador 2 (10pm/µL)	1
Taq (5U/µL)	0.5 (5U/µL)
Mostra	5

En el transcurs del treball es van emprar 2 termocicladors diferents (Personal Cycler de Biometra i Gene Amp ® PCR System 9700 de Perkin-Elmer). El programa d'amplificació va ser la següent:

Etapas	T°(C)	Temps	
		Biometra	PE9700
1	94	2 min	2 min
30 cicles	94	1 min	30 s
	67	45 s	20 s
	72	1min	30s
1	72	10 m	10 m
1	4	indefinidament	

b₃) Electroforesi

Per observar el resultat de l'amplificació per PCR es va procedir a fer una electroforesi horitzontal en gel d'agarosa.

Preparació del gel i càrrega de mostres:

1- Es pesa la quantitat d'agarosa necessària segons el percentatge final que es desitja. Es barreja l'agarosa amb el volum corresponent de tampó TAE 1(x). Normalment es realitzaven gels de l'1.2 a l'1.5% d'agarosa.

2- Es fon l'agarosa al microones, assegurant la completa fusió, i es deixa refredar fins a una temperatura aproximada de 50 °C.

3- S'aboca l'agarosa a la cubeta d'electroferesi, on prèviament s'han col·locat les pintes per formar les butxaques, i es deixa refredar fins a la completa solidificació.

4- Es cobreix el gel amb tampó TAE 1(x) i es carreguen les mostres (12.5 µL) barrejades amb tampó de càrrega (2.5 µL), posant els marcadors adients. En el present treball s'han emprat els marcadors: 1 Kb ladder, 1 Kb plus ladder i *Lambda-Eco RI/Hind III*, preparats a una concentració de 50 ng/µL.

L' electroforesi es va realitzar en condicions estàndard de 65 V durant 30 min.

Els gels es van visualitzar amb un transil·luminador de llum ultraviolada després de la tinció amb 1µg/mL de Bromur d'etidi en TAE 1(x) durant 20 min. Les imatges es van adquirir digitalment amb un analitzador d'imatges Gel 1000 Document de Biorad (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.), o bé amb un cambra digital DC120 (Kodak) acoblats a un ordinador. El càlcul de la mida dels fragments

obtinguts es va realitzar a partir de les imatges digitalitzades amb el software 1D Image Analysis System 120 (Kodak) o Molecular analyst TM/Pc 8 Versió 1.4 (Bio-Rad Laboratories U.S.A.).

c) Restricció dels fragments amplificats

Per tal de comprovar la identitat dels fragments amplificats de la mida esperada que es van obtenir es va realitzar una anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats després de la digestió del fragment amb els enzims de restricció adients.

Per a l'elecció dels enzims es va utilitzar el programa Strider TM 1.1. introduint les seqüències dianes de l'amplificació obtingudes en el GenBank corresponents als diferents gens amplificats. Es van escollir 2 enzims de restricció per a cada amplificat, de manera que presentessin 1 i 2 dianes respectivament i alhora que els fragments obtinguts fossin fàcilment identificats en el gel d'electroforesi (Taula 2.6).

Taula 2.6 Enzims de restricció emprats en aquest estudi.

Table 2.6 Restriction enzymes used in this study.

Amplificat de	Enzim	Diana de reconeixement	Nº dianes	Mida dels fragments (pb)
<i>phID</i>	<i>SaI</i> I	G/TCGAC	1	562, 184
	<i>Bsp</i> HI	T/CATGA	2	221, 393, 132
<i>prnD</i>	<i>Bsp</i> HI	T/CATGA	1	675, 156
	<i>Bgl</i> I	GCC(N) ₄ /NGGC	2	591, 240
<i>phzC-phzD</i>	<i>Bgl</i> I	GCC(N) ₄ /NGGC	1	537, 394, 219
	<i>Eco</i> RV	GAT/ATC	2	749, 401

N_x indica que qualsevol del les 4 bases es reconeguda per l'enzim

N_x characterizes ambiguous base pairs; any of the four base pairs may be reconized by the enzyme

Per evitar la presència d'algun fragment inespecífic, es va procedir a la realització d'una neteja del fragment obtingut. Partint de 25 µL de reacció en un microtub, es va realitzar la precipitació del DNA amb el Kit Gen Clean II[®] (BIO 101 Inc.).

El procediment és el següent:

1- S'afegeixen 25 µL d' aigua Milli-Q als 25 µL de reacció inicial, s'afegeixen 3 volums d' Iodur sòdic (I₂Na) per cada volum de reacció inicial (150 µL) i 10 µL de la reïna de sílice (abans d'agafar-la del tub, s'homogeneïtza amb un pols de vòrtex).

2- Es deixen en gel durant 10 min, i s'homogeneïtza amb vòrtex als 5 min.

3- Se centrifuga a 10.000 g durant 20 s i es descarta el sobrenedant.

4- Es renta 3 vegades el DNA amb solució de rentat (del mateix kit) que es guarda a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, s'afegeixen $500\text{ }\mu\text{L}$ de la solució de rentat, es fa un pols de vòrtex, es centrifuga durant 20 s a 10.000 g i es descarta el sobrenedant.

5- Se centrifuga 5 s més a 10.000 g i es descarta el sobrenedant.

6- Es dipositen els tubs oberts de 3 a 5 min en un incubador a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ per assegurar l'evaporació de restes d'etanol que podria interferir en posteriors reaccions.

7- S'elueix el DNA amb $20\text{ }\mu\text{L}$ d'aigua Milli-Q, fent un pols de vòrtex i incubant 5 min a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. En aquest pas, se segellen els microtubs amb parafilm per evitar l'evaporació.

8- Se separa la reïna de sílice, centrifugant 5 min a 10.000 g i es transvasa el sobrenedant a un nou microtub. El DNA està a punt per a la digestió o bé es pot mantenir a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins el moment del seu ús.

Per a la reacció de digestió, es prepara en un microtub de 0.5 mL de capacitat, la següent barreja per a cada digestió:

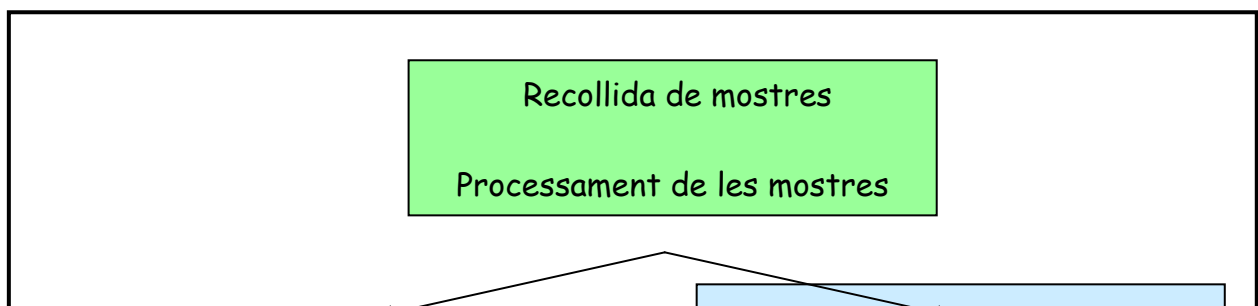
2.7 μL H_2O
 1.5 μL tampó corresponent a l'enzim (10x)
 10 μL mostra
 0.8 μL enzim

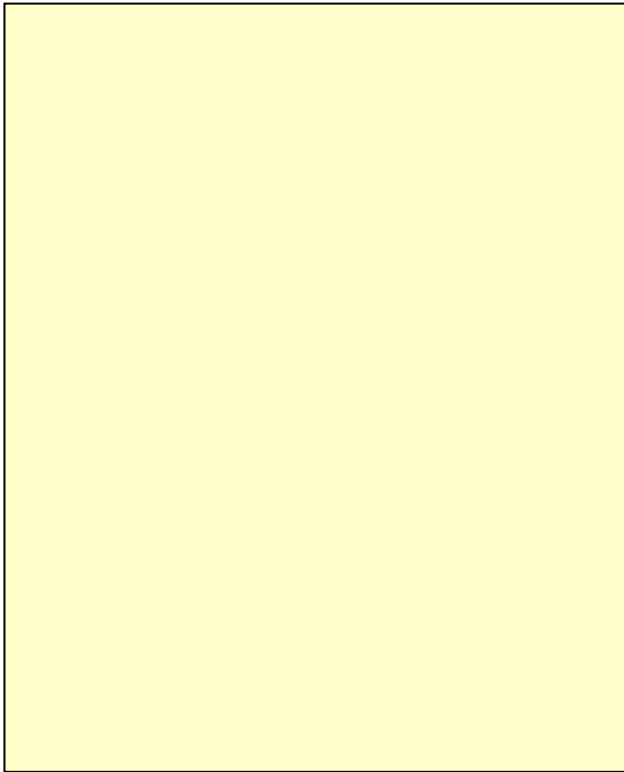
i s'incuba durant 3 h a la temperatura adient de l'enzim.

Per a la realització de l'electroforesi i visualització dels resultats es va procedir com en l'apartat b₃) anterior, variant la concentració d'agarosa fins al 2.5- 2.75 % i els marcadors emprats van ser d'1 kb Ladder i 100 pb, i es va deixar córrer durant 4 h a 65 V .

2.2.4 Avaluació de diferents estratègies per a la detecció de bacteris productors potencials dels antibiòtics floroglucinol i àcid fenazin-1-carboxílic en mostres naturals

En el cas de les fenazines, s'han descrit característiques fenotípiques indicatives de la producció, com és la presència d'un to grogós del cultiu (Palleroni 1984) que difon per la placa en Agar A de King (King i col. 1954). Quant a la producció de floroglucinol, aquesta està relacionada amb la producció d'un pigment vermellós que es difon en el medi de cultiu (sobretot en Agar B de King) i que no és el propi antibiòtic sinó un compost associat (Bangera i Thomashow 1996). La presència d'aquest pigment després d'incubar les plaques de 4 a 7 dies està relacionada amb la producció de PhI (Keel i col. 1996). En el locus biosintètic responsable de la producció de PhI s'han identificat sis inicis de lectura oberts (ORFs, Open Reading Frames) en un fragment de 6.5 Kb de DNA en la soca *P. fluorescens* Q₂₋₈₇. Aquest fragment és suficient per transferir la capacitat de producció de PhI a soques no productores (Cook i col. 1995). Els gens *phIA*, *phIB*, *phIC* i *phID* sembla que es troben en una unitat transcripcional. El gen *phIF* codifica per un repressor transcripcional, i *phIE* està associat a la presència del pigment vermell el qual es creu que està involucrat en el transport de PhI a l'exterior de la cèl·lula (Delany i col. 2000).





Protocol A

Protocol B

Figura 2.1 Protocols avaluats per a la detecció d'aïllats productors potencials dels antibiòtics Phl i PCA.
Figure 2.1 Protocols used to detect isolates potentially producing the antibiotics Phl and PCA.

Aquests marcadors fenotípics poden ser de gran ajuda per a la detecció de bacteris productors i també es poden emprar en l'avaluació de l'eficàcia de diferents estratègies basades en la detecció per PCR del gens biosintètics implicats en la biosíntesi de l'antibiòtic. A la figura 2.1 es mostren esquemàticament els dos protocols (A i B) que s'han portat a terme en aquest treball per a la recerca de soques productores de Phl i PCA. Cal dir que en primer lloc es va realitzar el protocol A en mostres de diferents orígens i quan es van obtenir resultats positius en algunes mostres es va procedir a la comparació dels dos protocols (A i B) en noves mostres del mateix origen.

2.2.4.1 Protocol A

El protocol A es basa en la sembra en placa en agar KB. A partir de les sèmres es van aïllar colònies fluorescents, i després de la purificació, es va comprovar per PCR la presència dels gens biosintètics. Aquest protocol correspon al descrit anteriorment en els apartats 2.2.1 i 2.2.3. i a la figura 2.1 està representat com a A₁. Gràcies als marcadors fenotípics, es va definir el protocol A₂ on es va avaluar visualment la producció de l'antibiòtic incubant les plaques dels aïllaments durant

un període més llarg de temps. En les plaques on es va observar la presència dels pigments propis de la producció de l'antibiòtic (marcadors fenotípics), es va procedir a la realització d'aïllaments de colònies i posterior comprovació per PCR de la presència dels gens biosintètics.

Es van recollir mostres de tres sistemes diferents: camps de cereals (1998) (Taula 2.7), de portaempelts de fruiters procedents d'un viver comercial situat a la població d'El Rebato (1999) (Taula 2.8) i de mostres de camp i de viviers de perera de la província de Girona (1999) (Taula 2.9). En el primer sistema es van emprar les arrels individuals de cada planta com a mostra, en el segon les arrels, la part aèria i en algun cas el substrat, mentre que en el tercer es van emprar solament les fulles de perera.

Taula 2.7 Mostres procedents de camps de cereals de Girona recollides durant 1998.

Table 2.7 Samples collected from cereal fields of Girona during 1998.

Mostra	Cultiu	Localització
1	Blat	Perelada (Alt Empordà)
2	Blat	Perelada (Alt Empordà)
3	Blat	Perelada (Alt Empordà)
4	Civada	Perelada (Alt Empordà)
5	Blat	Perelada (Alt Empordà)
6	Civada	Perelada (Alt Empordà)
7	Ordi cerveser	Santa Pau (Garrotxa)
8	Sègol	Santa Pau (Garrotxa)
9	Ordi cerveser	Santa Pau (Garrotxa)
10	Blat sense aresta	Santa Pau (Garrotxa)
11	Blat amb aresta	Santa Pau (Garrotxa)

Taula 2.8 Mostres procedents d'un viver comercial localitzat a la població El Rebato (Barcelona) recollides durant 1999.

Table 2.8 Samples collected from a commercial nursery located in El Rebato (Barcelona) during 1999.

Mostra	Espècie	Portaempelts	Part de la planta
1	<i>Prunus insititia</i>	Cirpac-2	aèria
2	<i>P. insititia</i>	Cirpac -2	radical
3	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Barrier	aèria
4	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Barrier	radical
5	<i>P. avium</i>	Santa Lucia 64	aèria
6	<i>P. avium</i>	Santa Lucia 64	radical
7	<i>P. besseyi x P. salicina</i>	Deep purple	aèria

Taula 2.8 Continuació

Table 2.8 Continuation

Mostra	Espècie	Portaempelts	Part de la planta
1	<i>Prunus insititia</i>	Cirpac-2	aèria
2	<i>P. insititia</i>	Cirpac-2	radical
3	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Barrier	aèria
4	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Barrier	radical
5	<i>P. avium</i>	Santa Lucia 64	aèria
6	<i>P. avium</i>	Santa Lucia 64	radical

Mostra	Espècie	Portaempelts	Part de la planta
7	<i>P. besseyi</i> x <i>P. salicina</i>	Deep Purple	aèria
8	<i>P. besseyi</i> x <i>P. salicina</i>	Deep Purple	radical
10	<i>P. dulcis</i> x <i>P. persica</i>	Felinem	radical
11	<i>P. domestica</i> x <i>P. persica</i>	Microbac2	aèria
12	<i>P. domestica</i> x <i>P. persica</i>	Microbac2	radical
13	<i>P. domestica</i>	Marianna 2624	aèria
14	<i>P. domestica</i>	Marianna 2624	radical
15	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	Mayor	aèria
16	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	Mayor	radical
17	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	Cadaman	aèria
18	<i>P. persica</i> x <i>p. davidiana</i>	Cadaman	radical
19	<i>P. persica</i> x <i>P. amygdalus</i>	GF-677	aèria
20	<i>P. persica</i> x <i>P. amygdalus</i>	GF-677	radical
21	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Rebato	aèria
22	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Rebato	radical
23	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Adafuel	aèria
24	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Adafuel	radical
25	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Monegro	aèria
26	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Monegro	radical
27	<i>P. cerasifera</i> x <i>P. munsioniana</i>	Marianna 4001	aèria
28	<i>P. cerasifera</i> x <i>P. munsioniana</i>	Marianna 4001	radical
29	<i>P. insititia</i>	Adesoto	aèria
30	<i>P. insititia</i>	Adesoto	radical
31	<i>P. domestica</i>	Tetra	aèria
32	<i>P. domestica</i>	Tetra	radical
33	<i>P. cerasifera</i>	29C Myrobalan	radical
34	-	-	substrat
35	<i>P. persica</i> x <i>P. amygdalus</i>	GF-677	aèria
36	<i>P. persica</i> x <i>P. amygdalus</i>	GF-677	radical
37	<i>P. cerasifera</i> x <i>P. munsioniana</i>	Marianna 2624	aèria
38	<i>P. persica</i> x <i>P. belsiana</i> x <i>P. domestica</i>	Isthara	aèria
39	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	Lucero	radical

Taula 2.9 Mostres de perera procedents de camps comercials i vivers de Girona recollides durant 1999.
Table 2.9 Samples collected from commercial orchards and nurseries of Girona during 1999.

Localitat	Comarca	Procedència
Sant Pere Pescador	Baix Empordà	P
Bàscara	Alt Empordà	P
Ventalló	Alt Empordà	P
Serra de Darò	Baix Empordà	P
La Tallada d'Empordà	Baix Empordà	P
Camòs	Pla de l'Estany	P
Santa Coloma de Farners	La Selva	P
Cassa de la Selva	Gironès	P
Riudellots	La Selva	P
L'Escala	Alt Empordà	P

Taula 2.9 Continuació
Table 2.9 Continuation

Localitat	Comarca	Procedència
Bàscara	Alt Empordà	-
Vilanna	La Selva	-
Bordils	Gironès	-
Celrà	Gironès	-
Castell-Platja d'Aro	Baix Empordà	-

Llagostera	Gironès	-
Banyoles	Pla de l'Estany	-

P, plantacions comercials, -, altres orígens (viver, parcel·les petites)
 P, comercial orchards, - non comercial orchards (nursery, small plots)

Quant a les mostres de cereals, es van rentar suaument les arrels en aigua estèril per treure les partícules de sòl més grolleres, es van introduir en un tub d'assaig amb 5 mL de tampó d'extracció 1 i es van exposar durant 1 min en un bany d'ultrasons.

Per la resta de mostres (portaempelts de fruiters i pereres de vivers i camps comercials) es pesaven de 1.5 a 2 g de material vegetal de la part aèria i s'homogeneïtzaven amb 20 mL de Tampó d'extracció 1 en un homogeneïtzador de pales durant 1 min. Si les mostren procedien del sistema radical, es rentaven les arrels en aigua estèril per treure les partícules de sòl més grolleres, es pesava 1 g i, després de barrejar-ho amb 20 mL de Tampó d'extracció 1, es procedia a l'homogeneïtzació com en les mostres de la part aèria.

En el cas dels sòls es pesava 1 g de sòl, afegint 20 mL de Tampó d'extracció 1 i a diferència dels anteriors, es van homogeneïtzar amb un agitador orbital durant 20 min a 150 rpm.

Els extractes es van diluir i sembrar en superfície en agar B de King (KB) contenint 100 µg/mL de cicloheximida per evitar el creixement de fongs.

Per a l'estratègia A₁ es va procedir com en l'apartat 2.2.1. En l'estratègia A₂ es van incubar les plaques durant 7 dies més i es va determinar el canvi de color del medi. En el cas d'observar canvi de color característic dels productors d'antibiòtics, es procedia a realitzar aïllaments i posterior purificació dels aïllats.

Dels aïllats obtinguts en A₁ i A₂ es va procedir a la detecció de la presència dels gens biosintètics per PCR tal com s'explica en l'apartat 2.2.3.

2.2.4.2 Protocol B

El protocol B es basa en l'ús de la PCR per a la detecció dels gens biosintètics tant directament dels extractes (B₁) com dels enriquiments d'aquests extractes vegetals (B₂). En aquest protocol cal guardar els extractes i els enriquiments de les diferents mostres en glicerinat a -80 °C, ja que en el cas d'obtenir una PCR positiva, s'ha de procedir a la sembra en superfície dels glicerinat i la realització de la hibridació en colònies per detectar les colònies portadores del gen i poder procedir a l'aïllament.

La recollida de mostres i el seu processament es van portar a terme com en el protocol A. En aquesta part del treball amb el protocol B es va realitzar paral·lelament el protocol A₂ amb les mateixes mostres a fi de disposar de la comparació dels resultats obtinguts en els dos casos.

Sensibilitat dels encebadors

Per a la utilització de la PCR com a eina per a la detecció dels gens biosintètics en els extractes vegetals, va determinar-se primer la sensibilitat dels iniciadors dissenyats per Raaijmakers i col. (1997) en cultiu pur i en extractes.

Es va realitzar una suspensió de soques portadores del gen d'interès en aigua destil·lada estèril a una concentració al voltant de 10^8 ufc/mL, fent un banc de dilucions decimals fins a 10 ufc/mL. La concentració de bacteris es va confirmar en tots els casos amb la realització d'un banc de dilucions i sembrant 50 µL de les dilucions adients en medi KB pel mètode de la gota.

En la realització de la PCR es van emprar 10 µL de cada una de les dilucions. Aquesta es va realitzar en un volum total de reacció de 50 µL, seguint el mateix protocol de l'apartat 2.2.3. Les soques utilitzades van ser *P fluorescens* Q₂₋₈₇ pel floroglucinol i *P fluorescens* 2-79 per l'àcid fenazin-1-carboxílic.

Per determinar la sensibilitat dels encebadors en els extractes vegetals, es van portar a terme assaigs paral·lels amb extractes procedents de fulles, d'arrels i de sòls. Les suspensions bacterianes es van barrejar amb extractes fins assolir les mateixes concentracions que en els cultius purs. Es va seguir un protocol simple d'extracció de DNA (Gorris i col. 1996, Llop i col. 1999) abans de la realització de la PCR. La PCR es va realitzar amb 5 µL del DNA extret com a mostra en un volum total de 50 µL seguint el mateix protocol de l'apartat 2.2.3.

L'extracció del DNA es va efectuar amb el següent protocol:

- 1- Es pren 1 mL de l'extracte d'interès i se centrifuga a 13.000 g durant 5 min.
- 2- Es descarta el sobrenedant, i es resuspèn el sediment amb 500 µL de tampó d'extracció 2, amb l'ajut del vòrtex i es deixa a temperatura ambient durant 1 h en moviment continu (mitjançant un adaptador del vòrtex especial per a microtubs).
- 3- Se centrifuga a 5.000 g durant 5 min.
- 4- Es prenen 450 µL del sobrenedant i es dipositen en un nou microtub, s'afegeixen 450 µL d'isopropanol, es barreja per inversió i es deixa reposar durant 1 h a temperatura ambient.
- 5- Se centrifuga de nou a 13000 g durant 10 min, es descarta el sobrenedant i es dipositen els microtubs invertits damunt de gradetes metàl·liques per facilitar la total evaporació de l'isopropanol.
- 6- Es resuspèn el sediment amb 200 µL d'aigua estèril.

Hibridació en colònies

A la figura 2.2 es mostren les diferents etapes per a la realització de la hibridació en colònies. A continuació es detallen els procediments.

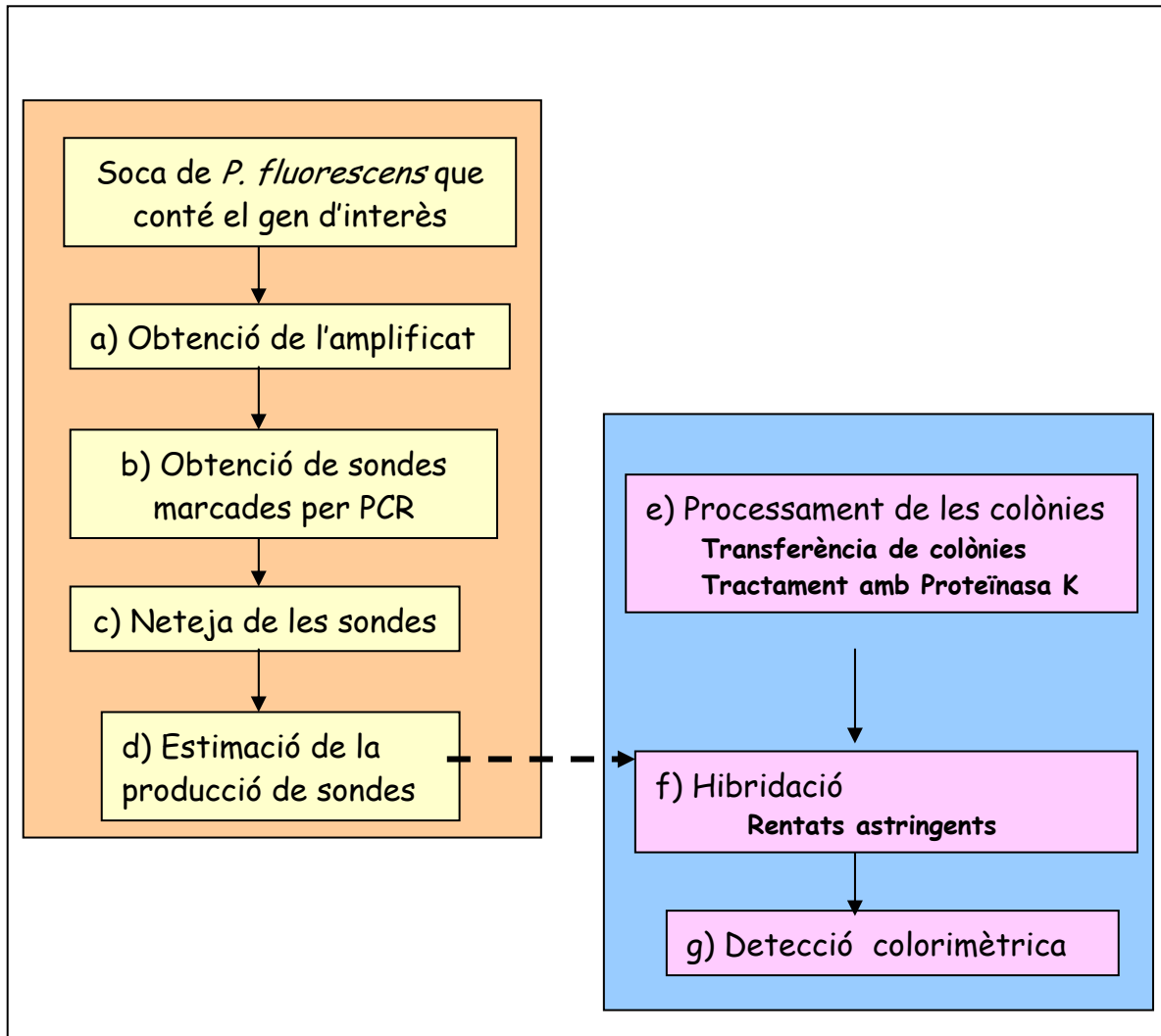


Figura 2.2 Esquema simplificat del protocol seguit en la hibridació en colònies.

Figure 2.2 Diagram of the colony hybridization steps used.

a) Obtenció de l'amplificat del gen d'interès per a l'obtenció de les sondes

A partir de l'amplificat dels gens biosintètics del PhI i PCA de les soques *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ i 2-79, que es van emprar com a controls positius de referència, es va procedir a la neteja de la banda obtinguda per electroforesi amb l'Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche Diagnostics).

Es procedeix de la següent manera:

1- Es pesa un microtub buit, se separa la banda d'interès del gel d'agarosa amb l'ajut d'un bisturí i es torna a pesar el microtub amb l'agarosa.

2- Es posen 300 µL de tampó de solubilització (vial 2) per cada 100 mg d'agarosa.

- 3- Es resuspèn la matriu de sílica (vial 1) al vòrtex fins a obtenir una suspensió homogènia i s'afegeixen 10 µL a la mostra
- 4- S'incuba la barreja durant 10 min a 55-60 °C fent un cop de vòrtex cada 2 min.
- 5- Se centrifuga 30 s a 13200 g i es descarta el sobrenedant.
- 6- Es resuspèn amb 500 µL de tampó d'unió al DNA (vial 3) i s'homogeneïtza amb el vòrtex.
- 7- Es repeteix el pas 5.
- 8- Es renta el sediment amb 500 µL de tampó de rentat (vial 4), es repeteix el pas 5
- 9- Es repeteix el pas 8.
- 10- Amb l'ajut d'una pipeta, s'acaba de descartar el sobrenedant, s'inverteix el tub damunt d'un absorbent i es deixa assecar a temperatura ambient durant 15 min. Es poden deixar els tubs a 37 °C durant 10 min per assegurar la total evaporació de l'etanol que conté el tampó de rentat.
- 11- Es posen 20-50 µL de tampó d'elució de DNA (EB). L'eficiència augmenta si el tampó d'elució s'aplica en dos cicles. En aquest treball, solament es realitzava una elució de 25 µL.
- 12- S'homogeneïtza amb el vòrtex i s'incuba a temperatura ambient durant 10 min, fent un cop de vòrtex cada 2 min.
- 13- Se centrifuga a 13.200 g durant 30 s i es traspassa el DNA del sobrenedant a un nou tub; cal tenir cura en no endur-se el material de la matriu.

b) Marcatge de les sondes

Es va realitzar amb el sistema PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics). Aquest mètode per marcar i detectar DNA es basa en la incorporació de Dig-11- dUTP en el procés d'amplificació per la PCR. Els fragments amplificats, en els que s'haurà incorporat aquest nucleòtid, són posteriorment reconeguts per anticossos conjugats amb enzims, de manera que amb l'addició del substrat adequat es pot realitzar la detecció del fragment amplificat.

Com a mostra es va emprar l'amplificat net obtingut en l'apartat anterior. Amb aquest mètode de marcatge per PCR s'assoleix una alta producció de sonda marcada. Les condicions d'amplificació són les mateixes que les descrites en l'apartat b₂ per a la PCR normal, emprant els reactius del Kit comercial.

El volum total de la reacció va ser de 50 µL, contenint:

Components	µL/ tub de reacció
H ₂ O	32.25
Tampó (10x, vial 3)	5
dNTPs* (2mM, vial 2)	5
E1*	1
E2*	1
Taq (5U/ L,vial1)	0.75
Mostra	5

(E1*, E2*, encebadors)

(E1*, E2*, primers)

c) Anàlisi del producte obtingut i separació de seqüències inespecífiques

Per a l'obtenció de les sondes marcades es va procedir a la realització d'una electroforesi. Les condicions d'electroforesi són les mateixes que en l'apartat b₃ (pàg. 75). Per a la separació de les seqüències inespecífiques, es va retallar la banda del gel d'agarosa i es va procedir a la neteja de la sonda mitjançant el protocol descrit al subapartat a anterior .

d) Estimació de la producció de les sondes

La concentració de la sonda obtinguda es va estimar amb el procediment de la gota dipositada en membranes de Nylon (Roche Diagnostics). Per tal de tenir un referent, es va emprar un estàndard del plasmidi pBR328 que està inclòs en el DIG Nucleic Acid Detection Kit (vial 1) (Roche Diagnostics). Es va procedir de la següent manera:

- 1- Es realitzen dilucions de l'estàndard (vial 1) a 1ng, 100, 10, 1,0. 1 i 0.01 pg en tampó de dilució de DNA (vial 2). S'agafen 5 µL del vial 1 i es dilueixen en 20 µL i les posteriors dilucions es realitzen prenent 5 µL en 45 µL de tampó de dilució. Aquestes dilucions són estables per un període d'un any si es mantenen a -20 °C.
- 2- De la sonda obtinguda, es preparen les mateixes dilucions que per l'estàndard.
- 3- Es dipositen gotes d'1µL de les dilucions, tant de l'estàndard com de la prova, al damunt d'una membrana de Nylon.
- 4- Es fixa el DNA dipositant la membrana al damunt d'un transil-luminador amb llum ultraviolada, 2 min per cada cara.
- 5- Es procedeix a la detecció del producte, tal com s'especifica en l'apartat g) que es troba a continuació.
- 6- Es comparen les intensitats del color obtingut en el control i la sonda i s'estima la concentració de sonda.

e) Hibridació en colònies

Per a la transferència de les colònies a la membrana es procedeix de la següent manera:

- 1- Es mantenen durant 30 min a 4 °C les plaques de cultius crescuts 24-48 h.
- 2- S'identifica la membrana i es diposita pel damunt de la superfície de la placa amb l'ajut d'unes pinces, dipositant primer la membrana al centre i deixant amb cura que ocupi la resta de la placa i evitant la formació de bombolles d'aire.
- 3- Es treu la membrana amb les pinces, es diposita en paper Whatman 3MM sec, i s'eixuga breument.
- 4- Es mullen 2 capes de paper Whatman 3MM amb Solució de desnaturalització, es posen les membranes (les colònies de cara amunt) entre els dos paper i es deixa 15 min. Eixugar breument amb paper sec.
- 5- Es fa el mateix amb papers humitejats amb solució de neutralització durant 15 min. Eixugar breument amb paper sec.
- 6- Es fa el mateix amb papers humitejats amb 2x SSC durant 10 min. Eixugar breument amb paper sec.
- 7- Es fixa el DNA a la membrana dipositant la membrana al damunt d'un transil-luminador amb llum ultraviolada, 2 min per cada cara.

Tractament amb Proteïnasa K

- 1- Es dilueix la proteïnasa K a 1.26 mg/mL en 2x SSC. Per exemple realitzant una dilució 1:10 (si la concentració original del producte comercial és de 12,6 mg/mL).
- 2- Es diposita la membrana, amb les colònies cara amunt, en una peça d'alumini neta i es distribueixen 0.5 mL de la solució a cada membrana.
- 3- S'incuba 1h a 37 °C.

4- S'humitegen 2 papers de filtre amb aigua Milli-Q estèril, es transfereixen les membranes entre el dos papers, i s'aplica pressió, per exemple passant una ampolla de vidre pel damunt. Es treu el paper de filtre superior on queda adherida la brutícia.

A partir d'aquesta membrana es pot procedir a la hibridació amb la sonda o guardar-la a 4 °C fins al moment de la seva realització.

f) Hibridació amb la sonda marcada

La hibridació de les sondes en les membranes es realitza amb el següent protocol:

- 1- Es dipositen en una safata les membranes amb solució de prehibridació DIG Easy Hyb. S'utilitzen 20 mL de solució per a cada membrana.
- 2- S'incuba 1h i 30 min a 42 °C.
- 3- Es desnaturalitza la quantitat necessària de sonda marcada, escalfant 5 min a 95-100 °C i es posa ràpidament en gel.
- 4- Es barreja la sonda marcada amb DIG Easy Hyb preescalfat a 42 °C (la concentració òptima de sonda ha d'oscil·lar entre 5-25 ng/mL). Per exemple en el cas d'una concentració de sonda de 20 ng/μL, s'empra 1μL de sonda per mL.
- 5- Es treu la solució d'hibridació. Aquesta es pot guardar en un tub resistent a congelació i ebullició (polipropilè) pel període d'un any si es manté a -20 °C. Aquesta sonda es pot reutilitzar escalfant-la prèviament a 68 °C durant 3min.

Els rentats de les membranes després de la hibridació amb la sonda es van realitzar en les següents condicions astringents:

- 1- Es renten les membranes 2 vegades durant 5 min en força quantitat de 2x SSC, 0.1% SDS a temperatura ambient en agitació suau (agitador orbital a 50 rpm)
- 2- Es transfereixen les membranes a 0.5x SSC, 0.1% SDS i es renten dos vegades durant 15 min a 68 °C amb agitació suau.

g) Detecció colorimètrica

La detecció colorimètrica s'ha realitzat amb el Nucleic Acid Detection Kit (Roche Diagnostics).

- 1- Després dels rentats astringents, s'equilibren les membranes en Tampó de rentat durant 1 min.
- 2- S'incuben les membranes en Solució de Blocking de treball (a 20° C), 30-60 min en agitació suau.
- 3- Es dilueix l'anti-dioxigenina-AP 1:5000 en Solució de Blocking (150 mU/mL). Es barreja per inversió del tub, és estable durant 12 h si es manté a 4 °C.
- 4- Es treuen les membranes del pas 2 i s'incuben 30 min en la solució preparada de l'anticòs (punt 3). La membrana ha d'estar ben coberta de la solució.
- 5- Es treu la solució de l'anticòs i es renta 2 vegades durant 15 min en tampó de rentat per treure els anticòssos que no estan units.
- 6- Es prepara la solució del substrat NBT+BCPI (vial 4) al moment. La relació de la solució ha de ser de 200 μL de NBT+BCPI per cada 10 mL de tampó de detecció. Cal protegir de la llum abans del seu ús.
- 7- S'equilibren les membranes en 20 mL de tampó de detecció durant 2 min.
- 8- Es treu el tampó de detecció i es reparteixen 10 mL del substrat a cada membrana, tenint cura que quedi ben coberta. S'incuba en una bossa segellada o safata a la foscor i vigilant de no moure. El desenvolupament del color comença als pocs min i pot continuar durant 12 h.
- 9- Es pot mirar de tant en tant el desenvolupament del color i per parar la reacció es renta la membrana amb aigua Milli-Q estèril durant 5 min.

Anàlisi de les mostres

Es van recollir mostres del sistema aeri i radical de plantes on es van aïllar bacteris portadors del gen *phlD* en l'apartat anterior procedents d'un viver comercial situat a la població d'El Rebato l'any 1999 (Taula 2.10).

Un cop realitzada l'extracció de les mostres com en el protocol A, es van guardar glicerinat al 20% a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de totes les extraccions i es va procedir també a la realització d'enriquiments per duplicat (0.5 mL de l'extracte amb 0.5 mL de medi) en dos medis líquids: KB líquid i KB modificat afegint antibiòtics KMB⁺ (Simon i Ridge 1974). En ambdós casos es van incorporar 100 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida per evitar el creixement dels fongs. Després de l'enriquiment es van guardar glicerinat a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ d'un dels dos duplicats de cada mostra (Figura 2.3)

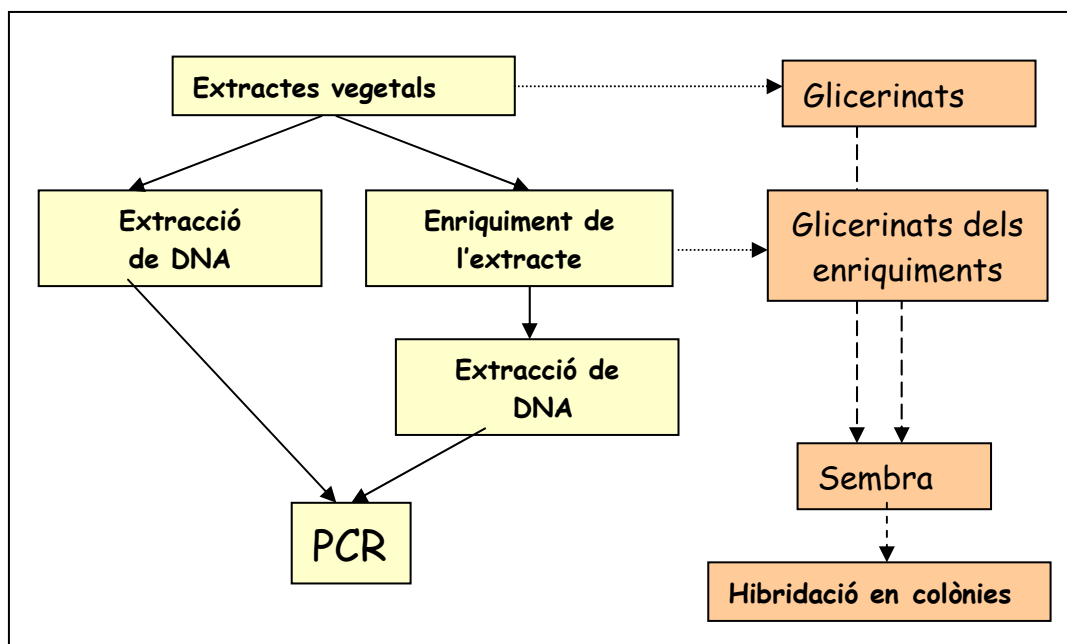


Figura 2.3 Protocol B. Les fletxes discontinües indiquen el procediment seguit quan la PCR era positiva.
Figure 2.3 Steps included in protocol B; dashed arrows indicate that the procedures were performed, only when PCR was positive.

Per a l'extracció de DNA es va emprar 1 mL de l'extracte (B₁) i dels enriquiments (B₂) i es va procedir a l'extracció de DNA amb el mateix protocol descrit en l'avaluació de la sensibilitat dels encebadors.

A continuació es va realitzar la PCR emprant un volum total de 50 μL utilitzant un volum de 5 μL dels extractes de DNA com a mostra, seguint el mateix protocol de l'apartat 2.2.3.

En el cas de que la PCR resultés positiva, es va procedir a realitzar dilucions dels enriquiments i posterior sembra en plaques per poder portar a terme la hibridació en colònies.

Taula 2.10 Mostres procedents d'un viver comercial localitzat a la població El Rebato (Barcelona) recollides durant el 1999 que es van utilitzar per realitzar el protocol B.

Table 2.10 Samples collected from a commercial nursery situated in El Rebato (Barcelona) during 1999 which were used in protocol B.

Mostra	Espècie	Portaampelts	Origen
1	<i>Prunus insititia</i>	Adesoto 101	Arrel
2	<i>P. insititia</i>	Adesoto 101	Fulla
3	<i>P. insititia</i>	Adesoto 101	Arrel
4	<i>P. insititia</i>	Adesoto 101	Fulla
5	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Cadaman	Arrel
6	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Cadaman	Fulla
7	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Cadaman	Arrel
8	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Cadaman	Fulla
9	<i>P. dulcis x P. persica</i>	Felinem	Arrel
10	<i>P. dulcis x P. persica</i>	Felinem	Fulla
11	<i>P. dulcis x P. persica</i>	Felinem	Arrel
12	<i>P. dulcis x P. persica</i>	Felinem	Fulla
13	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Barrier	Arrel
14	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Barrier	Fulla
15	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Barrier	Arrel
16	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Barrier	Fulla
17	<i>P. persica x P. amygdalus</i>	GF-677	Arrel
18	<i>P. persica x P. amygdalus</i>	GF-677	Fulla
19	<i>P. persica x P. amygdalus</i>	GF-677	Arrel
20	<i>P. persica x P. amygdalus</i>	GF-677	Fulla
21	<i>P. cerasifera x P. munsioniana</i>	Marianna 2426	Arrel
22	<i>P. cerasifera x P. munsioniana</i>	Marianna 2426	Fulla
23	<i>P. cerasifera x P. munsioniana</i>	Marianna 2426	Arrel
24	<i>P. cerasifera x P. munsioniana</i>	Marianna 2426	Fulla
25	<i>P. cerasifera</i>	29 c (Myrobalan)	Arrel
26	<i>P. cerasifera</i>	29 c (Myrobalan)	Fulla
27	<i>P. cerasifera</i>	29 c (Myrobalan)	Arrel
28	<i>P. cerasifera</i>	29 c (Myrobalan)	Fulla
29	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Cadaman	Substrat
30	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Cadaman	Substrat
31	<i>P. dulcis x P. persica</i>	Felinem	Substrat
32	<i>P. dulcis x P. persica</i>	Felinem	Substrat
33	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Barrier	Substrat
34	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Barrier	Substrat
35	<i>P. persica x P. amygdalus</i>	GF-677	Substrat
36	<i>P. persica x P. amygdalus</i>	GF-677	Substrat

Taula 2.10 Continuació

Table 2.10 Continuation

Mostra	Espècie	Portaampelts	Origen
37	<i>P. cerasifera x P. munsioniana</i>	Marianna 2426	Substrat
38	<i>P. cerasifera x P. munsioniana</i>	Marianna 2426	Substrat
39	<i>P. cerasifera</i>	29 c (Myrobalan)	Substrat
40	<i>P. cerasifera</i>	29 c (Myrobalan)	Substrat
41	<i>P. insititia</i>	Adesoto 101	Substrat
42	<i>P. insititia</i>	Adesoto 101	Substrat

Els tampons, els diferents reactius i els aparells emprats es descriuen el l'annex 2.

Restricció dels fragments amplificats dels aïllats obtinguts amb els protocols A i B.

Dels aïllats obtinguts en aquest apartat del treball, es va realitzar la restricció dels amplificats obtinguts per PCR amb encebadors específics, seguint el protocol descrit al subapartat c de l'apartat 2.2.3.2 de la present memòria.

2.3 Resultats

2.3 1 Aïllament de bacteris epífits

El primer objectiu d'aquest capítol ha estat l'aïllament de bacteris epífits, que pertanyessin al grup fluorescent de *Pseudomonas* i especialment de l'espècie *P. fluorescens*, per a poder realitzar la detecció de gens biosintètics de diferents antibiòtics. Els aïllaments es van realitzar en mostres molt diverses, pel que fa referència a l'origen geogràfic, l'espècie hoste i òrgans vegetals de procedència. Majoritàriament es van processar mostres procedents de finques comercials, sobretot de perera i de pomera de les comarques gironines, però també de plantes ornamentals procedents de vivers així com de gramínies procedents de camps cultivats. Es van processar un total de 450 mostres i per als aïllaments es van seleccionar solament una o dues colònies (si morfològicament s'observaven diferències) de cada mostra. Es va escollir aquest procediment per als aïllaments amb l'objectiu d'evitar que la col·lecció estigués formada per molts aïllats que fossin clons d'una mateixa soca.

A partir de la sembra de les dilucions dels extractes vegetals en agar KB, es va reunir una col·lecció d'un total de 406 aïllats fluorescents del conjunt de mostres processades durant els anys 1998-2000. Després del procés de purificació es van realitzar les proves de l'oxidasa i Gram. Tots els aïllats van resultar ser Gram negatius i d'entre aquests se'n van descartar 225 aïllats per ser oxidasa negatius ja que presumiblement podien pertànyer a l'espècie *P. syringae*. Els 181 aïllats restants, oxidasa positius, es va considerar que pertanyien a *Pseudomonas* (sensu stricto). A la taula 2.11 es mostren les característiques de cada aïllat pel que fa referència a l'òrgan de la planta, planta hoste, origen geogràfic i any d'aïllament

Taula 2.11 Relació dels aïllats Gram negatius, oxidasa positius i fluorescents en agar KB.

Table 2.11 List of isolates Gram negative, oxidase positive and fluorescent in KB agar .

Aïllat ⁽¹⁾	Espècie hoste ⁽²⁾	Localitat ⁽³⁾	Comarca	Òrgan	Procedència	Any aïllament
820	<i>Pyrus communis</i>	Bordils	Gironès	F	V	1999
821	<i>Eryobotrya</i> sp.	Banyoles	Pla de l'Estany	F	V	1999
822	<i>Photinia fraseri</i>	Pontós	Alt Empordà	F	V	1999
823	<i>Pyrus communis</i>	Banyoles	Pla de l'Estany	F	V	1999
824	<i>Cydonia oblonga</i>	Banyoles	Pla de l'Estany	F	V	1999
825	<i>Pyrus calleryana</i>	Bordils	Gironès	F	V	1999
826	<i>Malus</i> sp.	Bordils	Gironès	F	V	1999
827	<i>Malus</i> sp.	Bordils	Gironès	F	V	1999
828	<i>Pyrus</i> sp.	Banyoles	Pla de l'estany	F	V	1999
829	<i>Malus domestica</i>	Celrà	Gironès	F	V	1999
830	<i>Photinia fraseri</i>	Pontós	Alt Empordà	F	V	1999
831	<i>Pyrus calleryana</i>	Bordils	Gironès	F	V	1999

Taula 2.10 Continuació

Table 2.10 Continuation

Aïllat	Espècie hoste	Localitat	Comarca	Òrgan	Procedència	Any aïllament
832	<i>Pyrus calleryana</i>	Bordils	Gironès	F	V	1999
833	<i>Photinia fraseri</i>	Pontòs	Alt Empordà	F	V	1999
834	<i>Sobus aria</i>	Celrà	Gironès	F	V	1999
835	<i>Pyrus communis</i>	Celrà	Gironès	F	V	1999
836	<i>Pyrus communis</i>	Banyoles	Pla de l'Estany	F	V	1999
837	<i>Malus</i> sp.	Celrà	Gironès	F	V	1999
838	<i>Malus</i> sp.	Celrà	Gironès	F	V	1999
839	<i>Pyrus calleryana</i>	Celrà	Gironès	F	V	1999
840	<i>Photinia fraseri</i>	Pontòs	Alt Empordà	F	V	1999
841	<i>Malus</i> sp.	Celrà	Gironès	F	V	1999
842	<i>Malus</i> sp.	Bordils	Gironès	F	V	1999
843	<i>Pyrus communis</i>	Celrà	Gironès	F	V	1999
844	<i>Malus</i> sp.	Bordils	Gironès	F	V	1999
845	<i>Malus</i> sp.	Celrà	Gironès	F	V	1999
846	<i>Malus domestica</i>	Banyoles	Pla de l'Estany	F	V	1999
847	<i>Malus</i> sp.	Celrà	Gironès	F	V	1999
848	<i>Pyrus calleryana</i>	Celrà	Gironès	F	V	1999
849	<i>Sorbus aucuparia</i>	Bordils	Gironès	F	V	1999
850	<i>Pyrus calleryana</i>	Bordils	Gironès	F	V	1999
851	<i>Photinia fraseri</i>	Pontòs	Alt Empordà	F	V	1999
852	<i>Pyrus calleryana</i>	Celrà	Gironès	F	V	1999
853	<i>Malus</i> sp.	Bordils	Gironès	F	V	1999
854	<i>Photinia fraseri</i>	Pontòs	Alt Empordà	F	V	1999
855	<i>Photinia fraseri</i>	Pontòs	Alt Empordà	F	V	1999
856	<i>Pyrachanta</i> sp.	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
857	<i>Malus</i> sp.	Pont de Molins	Alt Empordà	F	V	1999
858	<i>Chaenomeles japonica</i>	Riudarenes	La Selva	F	V	1999
859	<i>Pyracantha</i>	Amer	La Selva	F	V	1998
863	<i>Malus</i> sp.	Serra de Daró	Baix Empordà	F	V	1998
867	<i>Pyrus communis</i>	Bàscara	Alt Empordà	F	V	1998
868	<i>Cotoneaster dammeri</i>	Pont de Molins	Alt Empordà	F	V	1999
869	<i>Sorbus</i> sp.	L'Escala	Alt Empordà	F	V	1999
870	<i>Crataegus monogyna</i>	Pont de Molins	Alt Empordà	F	V	1999
871	<i>Malus domestica</i>	Serra de Daró	Baix Empordà	F	V	1999
872	<i>Cotoneaster dammeri</i>	Pont de Molins	Alt Empordà	F	V	1999
874	<i>Crataegus monogyna</i>	Pont de Molins	Alt Empordà	F	V	1999
875	<i>Pyrus communis</i>	Cabanes	Alt Empordà	F	V	1999
876	<i>Pyrus communis</i>	Cabanes	Alt Empordà	F	V	1999
877	<i>Pyrus communis</i>	Celrà	Gironès	F	V	1999
878	<i>Sorbus intermedia</i>	Celrà	Gironès	F	V	1999
880	<i>Cotoneaster procumbens</i>	Riudarenes	La Selva	F	V	1999
881	<i>Sorbus</i> sp.	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
882	<i>Pyrus communis</i>	Sant Pere Pescador	Baix Empordà	F	P	1999
883	<i>Pyrus communis</i>	Sant Pere Pescador	Baix Empordà	F	P	1999
884	<i>Malus domestica</i>	Verges	Alt Empordà	F	V	1999
885	<i>Cotoneaster floccosus</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
886	<i>Cotoneaster suecicus</i>	Riudarenes	La Selva	F	V	1999
887	<i>Pyracantha</i> sp.	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
888	<i>Cotoneaster cochelatus</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
890	<i>Cotoneaster salicifolius</i>	Sant Gregori	Gironès	F	V	1999
891	<i>Sorbus aria</i>	Santa Coloma	La Selva	F	V	1999
892	<i>Cotoneaster procumbens</i>	Santa Coloma	La Selva	F	V	1999
893	<i>Malus domestica</i>	Bàscara	Alt Empordà	F	V	1998
894	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
895	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
896	<i>Malus</i> sp.	Verges	Alt Empordà	F	V	1999
897	<i>Malus</i> sp.	Verges	Alt Empordà	F	V	1999
898	<i>Malus domestica</i>	Serra de Daró	Baix Empordà	F	V	1999
899	<i>Malus domestica</i>	Serra de Daró	Baix Empordà	F	P	1999
900	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
901	<i>Malus domestica</i>	Verges	Baix Empordà	F	P	1999
902	<i>Cotoneaster lacteus</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
903	<i>Pyracantha</i> sp.	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
904	<i>Cotoneaster bullatus</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
905	<i>Cotoneaster suecicus</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
906	<i>Cotoneaster suecicus</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
907	<i>Cotoneaster horizontalis</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
908	<i>Cotoneaster</i> sp.	Regencós	Baix Empordà	F	V	1999

Taula 2.10 Continuació

Table 2.10 Continuation

Aïllat	Espècie hoste	Localitat	Comarca	Òrgan	Procedència	Any aïllament
909	<i>Cotoneaster</i> sp.	Regencós	Baix Empordà	F	V	1999
910	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
911	<i>Photinia fraseri</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
912	<i>Cotoneaster suecicus</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
913	<i>Crataegus monogyna</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
914	<i>Malus domestica</i>	Fontanilles	Baix Empordà	F	P	1999
915	<i>Photinia fraseri</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
916	<i>Malus domestica</i>	La Tallada d'Empordà	Baix Empordà	F	P	1999
917	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
918	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
924	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
926	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
927	<i>Crataegus monogyna</i>	Santa Pau	La Garrotxa	F	V	1999
928	<i>Cydonia oblonga</i>	Castell d'Aro	Baix Empordà	F	V	1998
931	<i>Pyracantha angustifolia</i>	Celrà	Gironès	F	V	1998
932	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
933	<i>Photinia fraseri</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
934	<i>Cotoneaster pannosa</i>	Pont de Molins	Alt Empordà	F	V	1998
935	<i>Cotoneaster procumbens</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
936	<i>Cotoneaster franchetii</i>	Santa Coloma de Farners	La Selva	F	V	1999
937	<i>Malus</i> sp.	Vilanna	La Selva	F	V	1998
938	<i>Pyrus communis</i>	Bàscara	Alt Empordà	F	V	1999
939	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
940	<i>Malus domestica</i>	Gualta	Baix Empordà	F	P	1999
942	<i>Eryobotrya japonica</i>	Regencós	Baix Empordà	F	V	1999
943	<i>Crataegus lavalleyi</i>	Celrà	Gironès	F	V	1998
944	<i>Eryobotrya japonica</i>	Regencós	Baix Empordà	F	V	1999
945	<i>Malus domestica</i>	Regencós	Baix Empordà	F	V	1999
946	<i>Malus domestica</i>	Regencós	Baix Empordà	F	V	1999
948	<i>Malus domestica</i>	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1999
949	<i>Malus domestica</i>	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1999
950	<i>Photinia fraseri</i>	Pontòs	Alt Empordà	F	V	1998
951	<i>Cotoneaster salicifolius</i>	Pontòs	Alt Empordà	F	V	1998
952	<i>Cotoneaster pannosa</i>	Pont de Molins	Alt Empordà	F	V	1998
953	<i>Cotoneaster</i> sp.	Pont de Molins	Alt Empordà	F	V	1998
954	<i>Pyrus communis</i>	Bàscara	Alt Empordà	F	V	1998
955	<i>Pyrus communis</i>	Bàscara	Alt Empordà	F	V	1998
956	<i>Crataegus laevigata</i>	Celrà	Gironès	F	V	1998
957	<i>Crataegus monogyna</i>	Santa Pau (la Fageda)	Garrotxa	F	V	1998
958	<i>Cotoneaster wardii</i>	Sant Gregori	Gironès	F	V	1998
959	<i>Malus domestica</i>	Regencós	Baix emporda	F	V	1998
960	<i>Malus floribunda</i>	Vall Llobrega	Empordà	F	V	1998
961	<i>Malus domestica</i>	Bordils	Gironès	F	V	1998
962	<i>Cotoneaster</i> sp.	Sant Gregori	Gironès	F	V	1998
963	<i>Malus</i> sp.	Gualta	Baix Empordà	F	P	1998
964	<i>Malus</i> sp..	Torroella de Montgrí	Baix Empordà	F	P	1998
965	<i>Malus</i> sp.	Torroella de Montgrí	Baix Empordà	F	P	1998
966	<i>Malus</i> sp.	Fortià	Alt Empordà	F	P	1998
967	<i>Malus</i> sp.	Ullà	Baix Empordà	F	P	1998
968	<i>Malus</i> sp.	Fortià	Alt Empordà	F	P	1998
969	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
970	<i>Malus</i> sp..	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
971	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
972	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
973	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
974	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
975	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
976	<i>Malus</i> sp..	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
977	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
978	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
979	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
980	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
981	<i>Pyrus communis</i>	Ventalló	Alt Empordà	F	P	1998
982	<i>Cotoneaster</i> sp.	Sant Hilari Sacalm	La Selva	F	V	1998
983	<i>Geranium pelargoni</i>	Mataró (Barcelona)	-	F	V	2000
984	<i>Malus</i> sp.	Ventalló	Alt Empordà	F	P	1998
985	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
986	<i>Malus</i> sp..	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998

Taula 2.10 Continuació

Table 2.10 Continuation

Aïllat	Espècie hoste	Localitat	Comarca	1	2	Any aïllament
987	<i>Malus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Alt Empordà	F	P	1998
988	<i>Malus</i> sp.	Parlavà	Baix Empordà	F	P	1998
989	<i>Pyrus</i> sp.	Serra del Daró	Baix Empordà	F	P	1998
990	<i>Pyrus</i> sp.	Serra del Daró	Baix Empordà	F	P	1998
991	nd	nd	nd	F	P	1999
992	<i>Malus</i> sp.	Bescanó	Gironès	F	P	1998
993	nd	Nd	nd	F	P	1999
994	<i>Pyracantha</i> sp.	Girona	Gironès	F	P	2000
995	<i>Prunus domestica</i>	El Rebato (Barcelona)	-	F	V	1999
996	<i>Prunus persica</i> x <i>P. davidiana</i>	El Rebato (Barcelona)	-	A	V	1999
997	<i>Photinia fraseri</i>	Sant Gregori	Gironès	F	V	1999
998	<i>Pyrus communis</i>	Serra de Daró	Baix Empordà	F	P	1999
999	<i>Pyrus communis</i>	Serra de Daró	Baix Empordà	F	P	1999
1000	<i>Malus domestica</i>	La Tallada d'Empordà	Baix Empordà	F	P	1999
1001	<i>Malus</i> sp.	Riumors	Alt Empordà	F	P	1998
1002	<i>Pyrus communis</i>	Serra del Daró	Baix Empordà	F	P	1998
1003	<i>Malus</i> sp.	Parlavà	Baix Empordà	F	P	1998
1004	<i>Prunus persica</i> x <i>P. davidiana</i>	El Rebato (Barcelona)	-	S	V	1999
1005	<i>Pyrus</i> sp.	Serra del Daró	Baix Empordà	F	P	1998
1006	<i>Prunus persica</i> x <i>P. davidiana</i>	El Rebato (Barcelona)	-	F	V	1999
1007	<i>Pyrus</i> sp.	Serra del Daró	Baix Empordà	F	P	1998
1008	<i>Pyrus communis</i>	La Tallada d'Empordà	Baix Empordà	F	P	1999
1009	<i>Pyrus communis</i>	La Tallada d'Empordà	Baix Empordà	F	P	1999
1010	<i>Malus</i> sp.	Ullà	Baix Empordà	F	P	1998
1011	<i>Zea mays</i>	El Salobral (Albacete)	-	S	C	2000
1012	<i>Zea mays</i>	El Salobral (Albacete)	-	S	C	2000
1013	<i>Zea mays</i>	Vilamayor (Saragossa)	-	S	C	2000
1014	<i>Zea mays</i>	Vilamayor (Saragossa)	-	S	C	2000
1015	<i>Zea mays</i>	Vilamayor (Saragossa)	-	S	C	2000
1016	<i>Zea mays</i>	Almuniente (Saragossa)	-	S	C	2000
1017	<i>Zea mays</i>	El Salobral (Albacete)	-	S	C	2000
1018	<i>Zea mays</i>	Almuniente (Osca)	-	S	C	2000
1019	<i>Malus domestica</i>	Serra de Daró	Baix Empordà	F	V	1999
1020	<i>Zea mays</i>	Santa Pau	Garrotxa	A	C	2000
1021	<i>Zea mays</i>	Santa Pau	Garrotxa	A	C	2000

⁽¹⁾ Tot i que l'aïllat procedeixi del mateix hoste, i tingui el mateix origen geogràfic, és aïllat de diferents mostres

⁽²⁾ Quant a l'espècie hoste, en les mostres procedents de sòl, s'ha especificat l'espècie cultivada, en les localitats de fora la província de Girona, es cita el nom de la localitat i la província entre parèntesis

1, procedència en relació a: A, arrel; F, fulla; S, sòl

2, procedència en relació a: V, vivers; P, plantacions comercials; C, camps cultivats

nd, no determinat

⁽¹⁾ In spite of belonging to the same host and geographic origin, they has been isolated from different samples.

⁽²⁾ In reference to the host, in the soil samples the type of crop is provided

1, origin in relation to: A, rot; F, leaf; S, soil

2, origin in relation to: V, nurseries, P, commercials orchards; C, grow field

nd, no determined

2.3.2 Disseny d'uns encebadors per a la detecció dels gens biosintètics de la pirrolnitrina (Prn)

Dels tres metabòlits més importants relacionats amb el biocontrol en *P. fluorescens*, mancava fins el moment en que es va realitzar aquest treball, el poder disposar d'encebadors per a la detecció dels gens biosintètics implicats en la producció de Pirrolnitrina.

De les seqüències dels encebadors que es van obtenir amb el programa SEQAID es va escollir el parell Prna i Prnb (Taula 2.12) que van semblar més adients per al seu ús en la PCR amb els criteris predeterminats que s'han citat en el material i mètodes d'aquest capítol. La temperatura d'anellament és semblant a la dels dos parells d'encebadors que es volen utilitzar pel Phl i PCA i

per tant es pot realitzar una PCR amb el mateix programa. La mida del fragment amplificat és de 830 pb de bases i, per tant, es pot resoldre en una electroforesi estandard junt amb els fragments de PhI i PCA. Quant a la cerca de possibles seqüències conegudes que poguessin hibridar amb els encebadors, no es van trobar seqüències dipositades en el GenBank que representessin problemes d'interferència en el seu ús. A la taula 2.13 es mostren totes les seqüències obtingudes pel programa BLAST. S'observa que solament dues seqüències que pertanyen a *Homo sapiens* en el cas de Prna i una de *Metarhizium anisopliae* de Prnb, presenten un 100% de coincidència en els darrers 5 nucleòtids de l'extrem 3' de l'encebador.

Taula 2.12 Característiques dels encebadors de Prn dissenyats i emprats en les anàlisis per PCR.
Table 2.12 Prn primers used for PCR analysis.

Encebador	Seqüència 5' ► 3'	G+C %	T (°C)	Posició ^a (pb)
Prna	TCAAGGACAAGCCGACCGAGT	57	68.1	5007
Prnb	GCAGCCCCGAACAGCACGAAGT	61	69.1	5837

^a posició de l'extrem 5' de l'encebador en la seqüència al GenBank

^a position of the 5' end of the primer in the database sequence GenBank

Taula 2.13 Seqüències no dianes que mostren similitud amb els encebadors de Prn dissenyats.
Table 2.13 Matches with no target sequences for the Prn primers.

	Gen	nº d'accés	% identitat ^(a)	% 3' ^(b)
Prna				
<i>Paracoccus denitrificans</i>	NADH-ubiquinona oxidoreductasa	M74171	95	80
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	dGTPasa	AF027507	76	0
<i>Homo sapiens</i>	exó	X91123	71	100
	mRNA transportador noradrenalina	M65105	71	100
<i>Methylobacterium extorquens</i>	oxidació del metanol	AF017435	81	20
Prnb				
<i>Plasmodium vivax</i>	una proteïna de superfície	D85254	76	40
<i>Streptomyces rosefulvus</i>	frenolicina	AF058302	71	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	proteïna d'unió a penicil·lina	U73780	71	0
<i>Homo sapiens</i>	desconegut	AC005920	71	0
<i>Metarhizium anisopliae</i>	nrr1	AJ006468	71	100
<i>Lepisma sp.</i>	18S	AF005458	71	60
<i>Drosophila melanogaster</i>	desconegut	AC002493	71	0

^(a) percentatge de nucleòtids que són comuns entre l'encebador i les altres seqüències dipositades en el GenBank obtingudes amb la cerca amb el programa BLAST.

^(b) percentatge de nucleòtids comuns en els últims 5 nucleòtids de l'encebador en l'extrem 3'.

^(a) based on comparison of primer sequences to GenBank by basic BLAST. The percentatge of nucleotides of the primers found in the database sequences listed are tabulated.

^(b) Identity of matching sequences to the five nucleotides at the 3' end of the primer.

Es va provar l'ús dels encebadors utilitzant com a control positiu *P. fluorescens* BL915, productora de pirrolnitrina i de la que s'havia seqüenciat el gen (Gen Bank U74493), i *P. fluorescens* CHA0 també productora de pirrolnitrina. Com a control negatiu es va utilitzar *P. fluorescens* SBW25.

El protocol i el programa del termociclador va ser el mateix que pels altres encebadors ja descrits de PhI i PCA. Els encebadors van amplificar el fragment esperat de DNA de 830 pb (Figura 2.4). El

fet de no disposar en aquell moment de més soques que fossin productores de pirrolnitrina no va permetre la comprovació de l'especificitat dels encebadors en altres soques. Malgrat això es va decidir emprar aquests encebadors en la detecció dels gens biosintètics en els aïllats utilitzats en aquests treball.

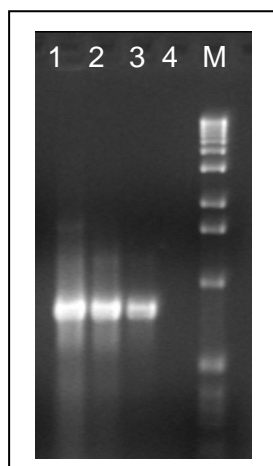


Figura 2.4 Electroforesi en gel d'agarosa dels productes amplificats per PCR a partir de *P. fluorescens* BL915 amb els encebadors Prna i Prnb; línies 1 a 3, diferents concentracions de *P. fluorescens* BL915; línia 4, control negatiu; M, marcador 1Kb DNA.

Figure 2.4 Agarose gel electrophoresis of the PCR products from *P. fluorescens* BL915 using primers Prna and Prnb; lanes 1 to 3, different concentrations of *P. fluorescens* BL915; lane 4, negative control; lane M, DNA 1 Kb ladder.

2.3.3 Detecció de la presència dels gens biosintètics dels antibiòtics 2,4-diacetilfloroglucinol (Phl), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) i Pirrolnitrina (Prn) en una col·lecció d'aïllats de *Pseudomonas* (*sensu stricto*)

Es va realitzar la prospecció dels gens biosintètics dels diferents antibiòtics per PCR en un total de 438 aïllats (14 soques cedides per altres investigadors, 6 soques de col·leccions de cultius, 183 aïllats obtinguts en aquest treball i 235 soques del socari de l'INTEA). En cada una de les PCR es va introduir un control positiu i un negatiu de referència per a cada parell d'encebadors.

Els resultats on es va obtenir com a mínim un resultat positiu es mostren a la taula 2.14, on es pot observar que, apart de les soques cedides per altres investigadors, el nombre de soques o aïllats que són portadors dels gens biosintètics és molt reduït en relació al nombre total d'aïllats estudiats. Solament 4 aïllats presenten i amplifiquen el fragment esperat de la PCA, 3 del floroglucinol i un de la pirrolnitrina. Així doncs, en la nostra col·lecció, el percentatge de soques positives és del 0.7 % pel Phl (3/418), 1 % pel PCA (4/418) i 0.2 % per la Prn (1/418).

Taula 2.14 Soques o aïllats positius en l'anàlisi per PCR amb els encebadors específics de Phl, PCA i Prn.

Table 2.14 Strains and isolates which were PCR positive with Phl, PCA and Prn primers.

Soca o aïllat	Phl	PCA	Prn
<i>P. fluorescens</i> CHA0	+	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. JBR1-70	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. JMP12-18	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> Ps15	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> Ps31	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> WB1	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> WB52	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> Q ₂₋₈₇	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> Q ₄₋₈₇	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> 2-79	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> BI915	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS263	-	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS317	+	-	-
Aïllat* 894	-	+	-
Aïllat* 895	-	+	-
Aïllat* 944	-	+	-
Aïllat* 1016	+	-	-
Aïllat* 1019	+	-	-

* Els aïllats s'identifiquen a nivell d'espècie en el capítol 3.

* Isolates will be identified to the species level in chapter 3.

De les tres soques o aïllats de la nostra col·lecció positius amb els encebadors de Phl, cal destacar que *P. fluorescens* EPS317 i l'aïllat 1016, procedeixen d'arrel de planta de tabac i de sòl de camp cultivat amb blat de moro, respectivament. L'aïllat 1019 és l'únic que prové de fulla, en concret, d'una pomera de viver.

Pel que fa referència a les 4 soques o aïllats positius amb el gen del PCA, dos (894, 895) provenen de dues mostres diferents però del mateix origen i, en ambdós casos, van ser aïllats de fulla i de pomera d'una plantació comercial. L'aïllat 944 procedeix també de fulla però de nesprrer d'un viver. Quant a *P. fluorescens* EPS263 va ser aïllada d'arrel de faig i aquesta soca és l'única que també ha resultat ser positiva amb els encebadors de la pirrolnitrina.

Es va observar en algunes soques i aïllats que, en la realització de la PCR amb els encebadors corresponents al Phl, PCA i Prn, amplificaven fragments de mida diferent (superior o inferior) a l'esperada. En alguns casos es van obtenir fins i tot patrons de bandes més complexes que semblaven més propis d'una tècnica de tipatge que no d'una amplificació simple definida.

Quant a les soques cedides per altres investigadors cal remarcar que es va obtenir amplificació amb els encebadors de Phl i Prn en *Pseudomonas* sp. WB1 i WB52. La referència d'aquestes soques indicava sols la producció d'àcid salicílic i HCN però no de Phl o Prn (Fakhouri i Buchenaer 1997).

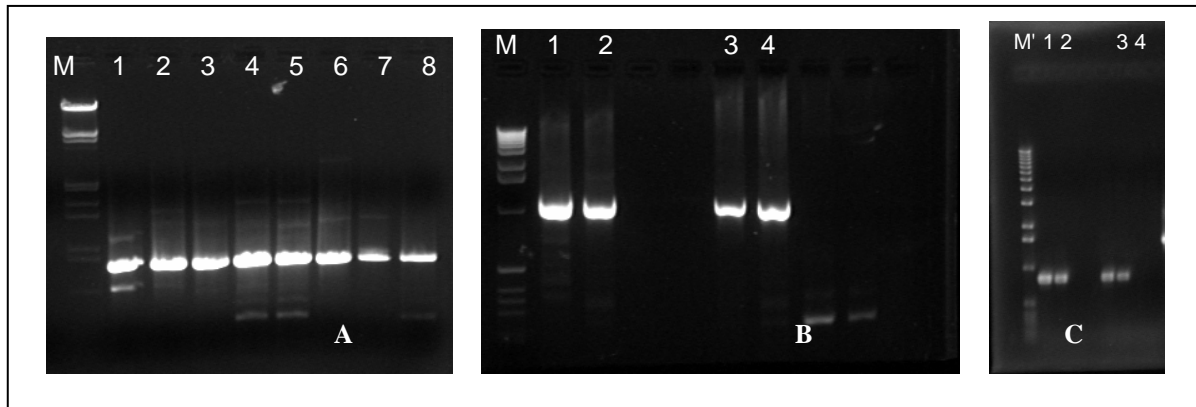


Figura 2.5 Electroforesi amb gel d'agarosa dels productes amplificats per PCR amb els encebadors (A): Phl2a i Phl2b. Línia M, marcador Lambda *EcoR* I/*Hind* III; línia 1, *P. fluorescens* EPS 317; línia 2, *Pseudomonas* sp. JBR1-70; línia 3, *Pseudomonas* sp. JMP12-18; línia 4, *P. fluorescens* WB1; línia 5, *P. fluorescens* WB52; línia 6 *P. fluorescens* Ps15; línia 7, *P. fluorescens* Ps31; línia 8, *P. fluorescens* CHA0. (B): PCA2a i PCA3b. Línia M marcador Lambda *EcoR* I/*Hind* III; línia 1, *P. fluorescens* 2-79; línia 2, *P. fluorescens* EPS263; línia 3, aïllat 894; línia 4, aïllat 945. (C): Prna i Prnb. Línia: M', marcador 1 Kb DNA; línia 1, *P. fluorescens* BL915; línia 2, *P. fluorescens* CHA0; línia 3, *P. fluorescens* WB1; línia 4, *P. fluorescens* WB52.

Figure 2.5 Agarose gel electrophoresis of the PCR products amplified with primers (A): Phl2a and Phl2b. Lane M, Lambda *EcoR* I/*Hind* III ladder; lane 1, *P. fluorescens* EPS 317; lane 2, *Pseudomonas* sp. JBR1-70; lane 3, *Pseudomonas* sp. JMP12-84; lane 4, *P. fluorescens* WB1; lane 5, *P. fluorescens* WB52; lane 6 *P. fluorescens* Ps15; lane 7, *P. fluorescens* Ps31; lane 8, *P. fluorescens* CHA0. (B): PCA2a and PCA3b. Lane M, Lambda *EcoR* I/*Hind* III ladder; lane 1, *P. fluorescens* 2-79; lane 2, *P. fluorescens* EPS263; lane 3, isolate 894; lane 4, isolate 945. (C): Prna and Prnb. Lane M', 1 Kb DNA ladder; lane 1, *P. fluorescens* BL915; lane 2, *P. fluorescens* CHA0; lane 3, *P. fluorescens* WB1; lane 4, *P. fluorescens* WB52.

Restricció dels amplificats obtinguts per PCR

Fragments amplificats del gen *phlD*

Per a comprovar la identitat dels fragments amplificats es van realitzar les restriccions dels amplificats obtinguts amb les soques de l'apartat anterior. Es van escollir dos enzims amb 2 i 1 punt de tall, respectivament, i es va tenir en compte en la seva elecció que la mida dels fragments es poguessin resoldre en gels d'agarosa convencionals i que el patró de fragments fos fàcilment interpretable. Els resultats obtinguts amb els enzims *SaI* I i *Bsp* HI es mostren a la figura 2.6. on s'observa que en alguns casos, tot i presentar alguna de les dianes de restricció, romanen encara fragments de la mida de l'amplificat o fragments que poden obtenir-se de digestions parcials (línies 7, 14 i 16 de la figura 2.6)

A la figura 2.6 es pot observar que els fragments del gen *phlD* presenten diversitat en la seva seqüència ja que s'obtenen diferents patrons entre les soques. A la figura 2.7 es mostra una representació esquemàtica del resultat conjunt de totes les soques amb cada un dels dos enzims emprats. Per a cada enzim s'observen dos grups de soques. Pel que fa referència a l'enzim *SaI* I hi ha un grup de 4 soques, *P. fluorescens* CHA0, EPS317, WB1 i WB52, que no tenen la diàna de tall present en la resta de soques. Quant a l'enzim *Bsp* HI, les mateixes soques i a més l'aïllat 1016 mostren també la manca d'una de les dues dianes de tall, en concret la diàna que es troba

en el fragment de 614 pb resultant els fragments de 393 i 221 pb. Així, els dos patrons obtinguts amb cada un dels enzims es corresponen bé en tots els casos a excepció de l'aïllat 1016, que es classifica amb la resta de soques en les digestions amb l'enzim *Sal*I i, per tant, mostrant que si té la diana de tall de l'enzim.

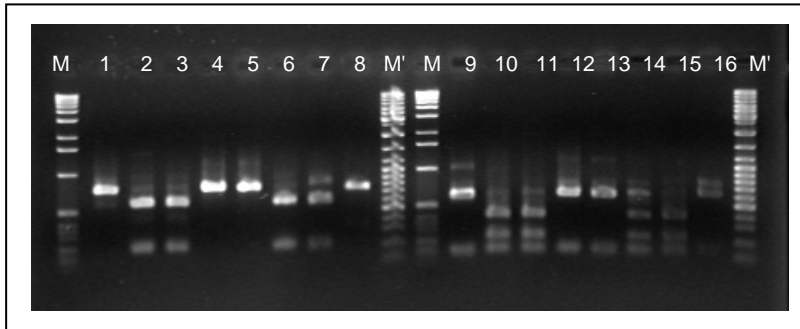


Figura 2.6 Electroforesi amb gel d'agarosa de les digestions dels fragments amplificats per PCR amb els iniciadors Phl2a i Phl2b, realitzades amb els enzims *Sal*I (línies 1 a 8) i *Bsp*H I (9 a 16). Línies M, marcador 1 Kb DNA; línies M', 100 pb DNA (MBI); línies 1 i 9, *P. fluorescens* EPS317; línies 2 i 10, *Pseudomonas* sp.JBR170; línies 3 i 11, *Pseudomonas* sp.JMP1218; línies 4 i 12, *P. fluorescens* WB1; línies 5 i 13, *P. fluorescens* WB52; línies 6 i 14, *P. fluorescens* Ps15; línies 7 i 15, *P. fluorescens* Ps31; línies 8 i 16, *P. fluorescens* CHA0.

Figura 2.6 Agarose gel electrophoresis of the restrictions of PCR products obtained with primers Phl2a and Phl2b, digested with *Sal*I (lanes 1 to 8) and *Bsp*H I (9 to 16). Lanes M, 1 Kb DNA ladder; lanes M', 100 pb DNA (MBI); lanes 1 and 9, *P. fluorescens* EPS 317; lanes 2 and 10, *Pseudomonas* sp.JBR170; lanes 3 and 11, *Pseudomonas* sp.JMP1218; lanes 4 and 12, *P. fluorescens* WB1; lanes 5 and 13, *P. fluorescens* WB52; lanes 6 and 14, *P. fluorescens* Ps15; lanes 7 and 15, *P. fluorescens* Ps31; lanes 8 and 16, *P. fluorescens* CHA0.

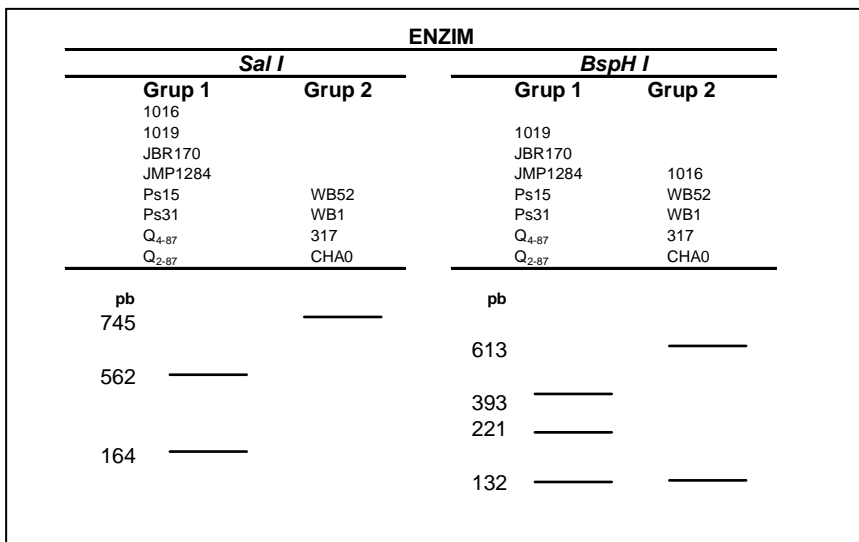


Figura 2.7 Patrons de bandes de RFLP del gen *phlD* emprant dos enzims de restricció.

Figure 2.7 RFLP banding patterns of *phlD* gene using two restriction enzymes.

Amb aquests resultats sembla que l'enzim més adient per comprovar la identitat de l'amplificat seria el *Sal*I si en la restricció s'obtenen com a mínim dos o els tres fragments esperats. Per altra

banda, aquests resultats mostren que cal conèixer regions que estiguin altament conservades per escollir un enzim de restricció que sigui útil i inequívoc en la identificació del fragment amplificat obtingut.

Fragments amplificats amb els encebadors de PCA

Igual que amb els amplificats de PhI, es van escollir 2 enzims amb un i dos talls de restricció, el *Bgl* I i l'*EcoR* V. Els resultats de les restriccions obtingudes es mostren a la figura 2.8.

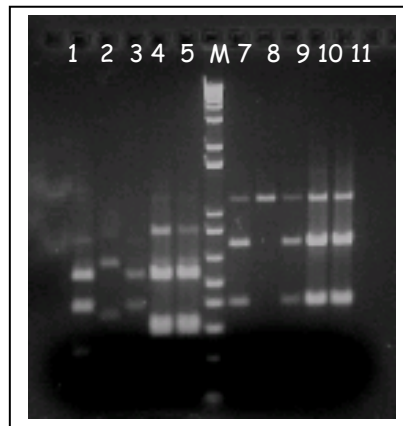


Figura 2.8 Electroforesi amb gel d'agarosa de les digestions dels fragments amplificats per PCR utilitzant els encebadors PCA2a i PCA3b, amb l'enzim *Bgl* I (línies 1 a 5) i *EcoR* V (7 a 11). Línia M, 1 Kb plus DNA ladder; línies 1 i 7, *P. fluorescens* 2-79; línies 2 i 8, *P. fluorescens* EPS 263; línies 3 i 9, aïllat 944; línies 4 i 10, aïllat 894; línies 5 i 11, aïllat 895.

Figura 2.8 Agarose gel electrophoresis of the restrictions of PCR products obtained with primers PCA2a and PCA32b, digested by *Bgl* I (lanes 1 to 5) i *EcoR* V (7 to 11). Lane M, 1 Kb plus DNA ladder; lanes 1 and 7, *P. fluorescens* 2-79; lanes 2 and 8, *P. fluorescens* EPS263; lanes 3 and 9, isolate 944; lanes 4 and 10, isolate 894; lanes 5 and 11, isolate 895.

La soca de referència *P. fluorescens* 2-79 i l'aïllat 944 produeixen els fragments esperats amb l'enzim *Bgl* I, mentre que s'observa una gran diferència en la soca *P. fluorescens* EPS263 i el grup dels dos aïllats (894, 895) que comparteixen el mateix patró, observant-se un fragment menys intens de 850 pb, un de 537 pb i dos fragments d'aproximadament 295 i 315 pb, que es poden observar en la figura 2.8 quasi amb l'aspecte d'una banda doble; donada l'amplada que presenta, es van considerar dues bandes de semblant pes molecular i no una de doble.

Pel que fa referència a l'enzim *EcoR* V, a excepció de la soca EPS263, la resta produeixen els fragments esperats de 749 i 401 pb, i també s'observen fragments que corresponen a la mida del fragment sense digerir. A la soca EPS263 hi manca la diana de reconeixement d'aquest enzim. A la figura 2.9 s'ha representat esquemàticament el resultat conjunt. Per a l'enzim *Bgl* I es poden distingir tres patrons característics i 2 per a l'enzim *EcoR* V.

ENZIM					
<i>Bgl</i> I			<i>EcoR</i> V		
Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 1	Grup 2	
EPS944 2-79	EPS263	EPS894 EPS895	EPS944 EPS895 EPS894 2-79	EPS263	
pb	pb	pb	pb		
		850	1150	————	
	630	537	749	————	
537	————				

Figura 2.9. Patrons de bandes de RFLP dels gens de PCA emprant dos enzims de restricció. La línia discontinua indica un fragment de baixa intensitat en el gel.

Figure 2.9. RFLP banding patterns of PCA amplified genes using two restriction enzymes. Dashed arrow indicates a low intensity fragment

Amb aquest resultat, no podem definir tampoc cap enzim per ser emprat com a comprovació de la identitat dels fragments. L'enzim *EcoRV* seria adient en el cas de que hagués tallat l'amplificat que correspon a la soca EPS263, però malauradament en aquesta seqüència no s'hi troba la diana de reconeixent.

Fragments amplificats del gen *prnD*

A l'igual que amb els amplificats de *Phl* i PCA, es van escollir 2 enzims amb un i dos talls de restricció, el *Bgl* I i el *Bsp* HI. Els resultats obtinguts tant amb l'enzim *Bsp* HI (681 i 156 pb) com *Bgl* I (597 i 240 pb) mostren que qualsevol d'aquests enzims es podria emprar per a la confirmació de la identitat dels amplificats a l'obtenir-se en ambdós casos els fragments esperats (Figura 2.10).

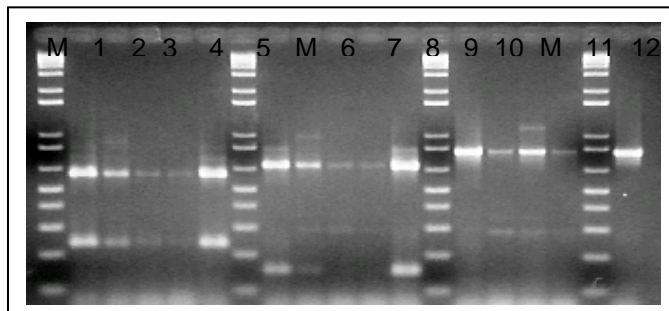


Figura 2.10 Electroforesi amb gel d'agarosa de les digestions dels fragments amplificats per PCR de *Pseudomonas* amb els iniciadors *Prna* i *Prnb* sense digerir (línies 11 a 15) o digerit amb els enzims *Bgl* I (línies 1 a 5) i *Bsp* HI (6 a 10). Línia M, 1 Kb plus DNA ladder; línies 1, 6 i 11, EPS263; línies 2, 7 i 13, WB1; línies 3, 8 i 12, WB52; línies 4, 9 i 14, CHA0; línies 5, 10 i 15, BI915.

Figura 2.10 Agarose gel electrophoresis of the restrictions of PCR products obtained with primers *Prna* and *Prnb* from *Pseudomonas* without digestion (lanes (11 to 15), digested by *Bgl* I (lanes 1 to 5) or *Bsp* HI (6 to 10). Lane M, 1 Kb plus DNA ladder; lanes 1, 6 and 11, EPS263; lanes 2, 7 and 13 WB1; lanes 3, 8 and 12, WB52; lanes 4, 9 and 14, CHA0; lanes 5, 10 and 15, BI915.

2.3.4 Avaluació de diferents estratègies per a la detecció de bacteris portadors dels gens biosintètics dels antibiòtics floroglucinol i àcid fenazin-1-carboxílic en mostres naturals

Per a l'avaluació de les estratègies en la recerca d'aïllats productors de PhI i PCA, calia comprovar en primer lloc la utilitat dels marcadors fenotípics de la producció de fenazines i floroglucinol descrits en l'apartat de materials i mètodes. En ambdós casos els marcadors corresponien a la producció de pigments que proporcionen una coloració característica al medi de cultiu on creixen les colònies productores d'antibiòtics (Figures 2.11 i 2.12).

En el cas dels productors d'antibiòtics del grup de les fenazines, no es va aconseguir una identificació i diferenciació clara de la coloració entre soques productores i no productores en Agar A de King en comparació amb altres medis emprats. Inclusivament es va provar el canvi de l'ingredient proteosa peptona N^o3 (especial per posar de manifest la producció de sideròfors) per una altra peptona bacteriològica (medi descrit en aquest treball com KA modificat (KA2)). A la figura 2.11 es compara el resultat de les sèmres d'una soca productora, d'una portadora del gen (amplificat en la PCR amb els encebadors específics) i d'una no productora de PCA en medi KB i KA2.

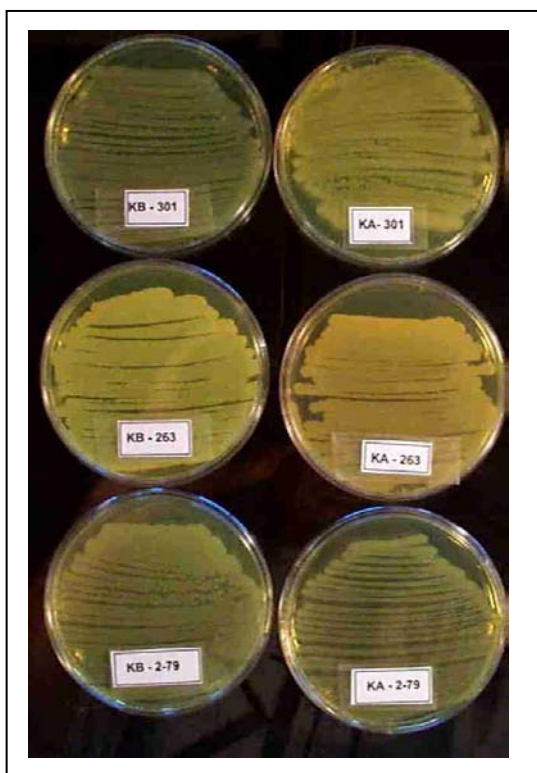


Figura 2.11 Plaques de Petri amb els medis de cultiu agar KB, KA sembrades amb una soca productora (*P. fluorescens* 2-79), una portadora del gens biosintètics (*P. fluorescens* EPS263) i una soca no productora de PCA (*P. fluorescens* EPS301).

Figure 2.11 Kb and KA agar Petri dishes with strains producing PCA (*P. fluorescens* 2-79), harboring the biosynthetic genes (*P. fluorescens* EPS263) and non-producing (*P. fluorescens* EPS301).

Com es pot apreciar, no s'observen diferències i, subjectivament, semblen més similars les plaques KA-301 (no productora) i la KA-263 (productora), que no les plaques que corresponen a les dos soques productores (2-79 i EPS263). Per aquest motiu es va descartar ja d'inici la utilització d'aquest marcador fenotípic en la recerca de soques productores de PCA.

En canvi, a la figura 2.12 es pot observar amb claredat la diferència de color de les plaques de KB, KA i KA(2) entre una soca productora de floroglucinol (*Q₂₋₈₇*), i un aïllat portador del gen *phID* (807) en comparació amb una soca no productora de floroglucinol (EPS227).

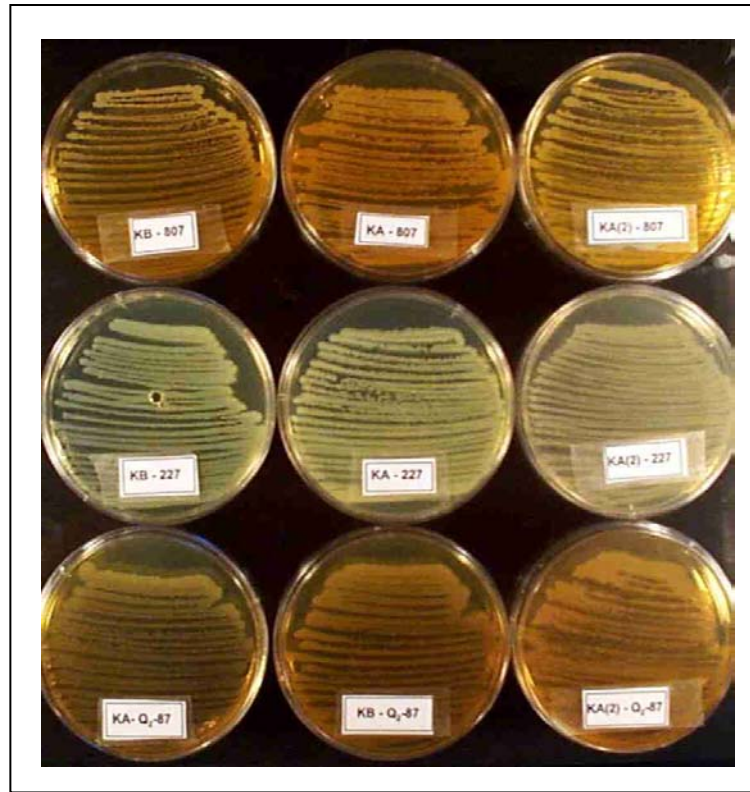


Figura 2.12 Plaques de Petri amb medi agar KB, KA i KA modificat (KA2) sembrades amb una soca productora de floroglucinol (*P. fluorescens Q₂₋₈₇*), un portador dels gens biosintètics (aïllat 807) i una soca no productora de floroglucinol (*P. fluorescens EPS227*).

Figure 2.12 KB, KA and KA modified (KA2) agar Petri dishes with strains producing PhI (*P. fluorescens Q₂₋₈₇*), harboring the biosynthetic genes (isolate 807) and non-producing (*P. fluorescens EPS227*).

2.3.4.1 Protocol A

De les plaques sembrades en KB, es van aïllar les colònies fluorescentes i, posteriorment, es van mantenir aquestes plaques a l'incubador per un període addicional d'uns 7 dies.

Del primer grup de mostres (Taules 2.7 a 2.9 en materials i mètodes), es van obtenir 70 aïllats de les mostres tenint en compte que per a l'aïllament es prenen les colònies que mostraven una morfologia clarament diferenciable en cada mostra amb l'objectiu de no seleccionar clons de la mateixa soca. Cap d'aquests 70 aïllats va amplificar el fragment esperat quan es va realitzar la PCR amb els encebadors de *phID*.

Pel que fa referència a les plaques incubades durant 7 dies, es va observar una coloració vermella en algunes de les plaques de mostres procedents del viver comercial localitzat a la població El Rebato. Amb l'objectiu de no perdre l'aïllat productor del pigment, es va realitzar una

purificació de diferents colònies, en total unes 25, i en cada pas de la purificació es va realitzar una PCR per comprovar la presència del gen *phlD* en el conjunt d'aïllats repicats. Amb aquesta metodologia d'aïllament dirigit es van obtenir 12 aïllats en cultiu pur que eren PCR positius i que procedien de 8 de les 39 mostres processades d'El Rebato. A la taula 2.14 es mostra la relació dels aïllats amb els portaempelts i la part de la planta d'on van ser obtinguts.

Taula 2.14 Aïllats bacterians positius per PCR amb els encebadors del gen *phlD* obtinguts del viver comercial d' El Rebato.

Table 2.14 Bacterial isolates obtained from a commercial nursery (El Rebato) which were PCR positive with *phlD* primers

Aïllats	Mostra	Portaempelts	Espècie	Part de la planta
807, 808, 809	22	Rebato 9501	<i>P.persica x P. dulcis</i>	Arrel
810	31	Tetra	<i>P. domestica</i>	Aèria
811, 815	32	Tetra	<i>P. domestica</i>	Arrel
812	33	29 C Myrobalan	<i>P. cerasifera</i>	Arrel
813	39	Lucero FA9502	<i>P.persica x P. dulcis</i>	Arrel
814	2	Cirpac-2	<i>P. insititia</i>	Arrel
816,818	38	Ishtara	<i>P. persica x P. belsiana x P. domestica</i>	Aèria
817	6	Santa Lucia 64	<i>P. avium</i>	Arrel

Es van observar coloracions marronoses (veure la figura 2.13) i d'altres tons com negrós o blavós en algunes plaques de cultiu incubades durant 7 dies. Malgrat tot, les plaques de les mostres seleccionades tenien un to més vermellós que la resta de plaques.

Els aïllats 807 a 818 provenien de 7 dels 20 portaempelts processats com a mostres. Tres dels aïllats procedien de la part aèria i els restants del sistema radical. Solament en el portaempelt TETRA (*Prunus domestica*) encara que no de la mateixa planta, es van obtenir aïllats portadors del gen *phlD* tant de la part aèria (aïllat 810) com del sistema radical (aïllats 811 i 815).

En la resta de mostres procedents de camps de cereals, vivers i plantacions de fruiters, no es va obtenir cap resultat positiu.

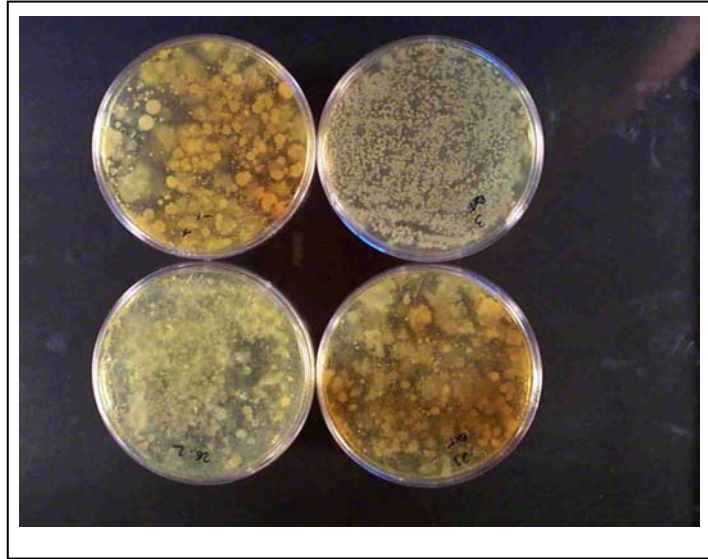


Figura 2.13 Plaques de KB sembrades amb dilucions de diferents mostres. El color marronós que s'observa no correspon al pigment vermellós indicatiu de la producció d'antibiòtic que pot observar-se en la figura 2.12.
Figure 2.13 Agar Petri dishes of KB of different dilutions from different samples. The brownish colour is not indicative of the production of phloroglucinol, observed in figure 2.12.

Un cop comparats els resultats dels dos procediments d'aïllament del protocol A amb els tres grups de mostres (camps de cereals, vivers i finques comercials) i identificat un sistema on va ser possible l'aïllament de portadors dels gens biosintètics del floroglucinol, es va procedir a la comparació del protocol A₂ (utilització de marcadors fenotípics per als aïllaments i posterior comprovació per PCR de la presència dels gens biosintètics) enfront el protocol B (detecció directa dels gens en els extractes i enriquiments i el posterior aïllament assistit amb la tècnica de la hibridació en colònies).

2.3.4.2 Protocol B

Abans d'emprar la PCR com a eina per a la detecció dels gens biosintètics dels antibiòtics en extractes vegetals i de sòls, es va determinar la sensibilitat dels encebadors. La determinació de la sensibilitat es va realitzar primer en cultius purs de dues soques productores i, per tant, portadores dels gens de PhI (*P. fluorescens* Q₂₋₈₇ i CHA0) i una soca productora de PCA (*P. fluorescens* 2-79). A continuació es va procedir a la determinació de la sensibilitat en extractes vegetals (de la part aèria i radical) i del substrat, inoculant les soques artificialment. En el primer cas la determinació de la sensibilitat es va realitzar directament a partir de suspensions de les soques i en el cas dels extractes després d'un pas previ d'extracció de DNA.

Sensibilitat dels encebadors

Els encebadors del PhI detecten les mostres inoculades amb cultius purs en les concentracions corresponents a 10⁴ ufc/mL, algunes vegades també s'ha pogut observar una banda molt tènue a concentracions de 10³ ufc/mL (carregant 12.5 µL de la reacció en el gel d'agarosa). Al no observar-

se sempre la presència del fragment amplificat a la concentració de la mostra que correspon a 10^3 ufc/mL, s'assumeix que la sensibilitat és la corresponent a les mostres amb 10^4 ufc/mL. Aquesta sensibilitat correspon a uns 100 bacteris diana en el tub de reacció de PCR. La sensibilitat en els extractes vegetals de la part aèria es de 10^4 - 10^5 ufc/mL i en la part radical solament es detecta a partir de 10^5 - 10^6 ufc/mL (Figura 2.14). En el cas del sòl, no s'observen fragments amplificats, llevat d'alguna de les reaccions de PCR que es van realitzar en les concentracions de 10^7 - 10^8 ufc/mL, probablement degut a un problema d'inhibició.

Pel que fa referència a la PCA, aquesta sensibilitat disminueix, en tots els casos, una potència de 10 en relació al floroglucinol, detectant en cultiu pur 10^4 - 10^5 ufc/mL. Això implica que per a la detecció, la concentració en el tub de reacció de PCR correspon com a mínim de 100 a 1000 bacteris diana. Paral·lelament en els extractes vegetals, la sensibilitat és 10 vegades inferior que pel Phl tant en fulles com en arrels.

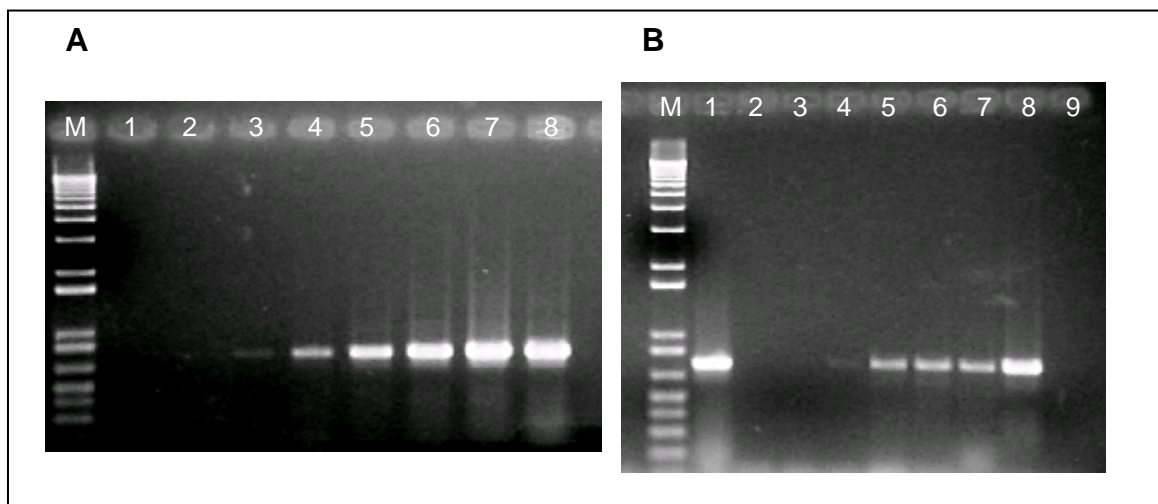


Figura 2.14 Sensibilitat dels encebadors per la detecció dels gens del floroglucinol (A) en cultiu pur; línia M, marcador 1 Kb plus; línies 1 a 8, cultiu pur de *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ corresponents a concentracions de les dilucions de 10^1 a 10^8 ufc/mL; (B), en extractes de fulla inoculats amb suspensions de *P. fluorescens* Q₂₋₈₇; línies 1 i 9 control positiu i negatiu, respectivament; línies 2 a 8 corresponents a concentracions finals de 10^2 a 10^8 ufc/mL.

Figure 2.14 Sensitivity of the phloroglucinol primers; lane M. 1 Kb plus DNA ladder; lanes 1 to 8, pure culture of *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ with a final cell concentration ranging from 10^1 to 10^8 cfu/mL; (B), leaf extract inoculated with a bacterial suspension rot extract inoculated with a bacterial suspension of *P. fluorescens* Q₂₋₈₇; lanes 1 and 9, positive and negative control; lanes 2 to 8 with a final cell concentration ranging from 10^2 to 10^8 cfu/mL.

De les 42 mostres processades, solament es van observar 3 bandes molt tènues en 3 casos. Dos de les mostres, la 6 i la 8 provenien de la part aèria i l'altra mostra, la 7, de la part radical de portaempelts Cadaman (*P. persica* x *P. davidiana*) (Figura 2.15).

Dels enriquiments d'aquestes 42 mostres processades, que s'havien realitzat en els dos medis líquids (KB i KMB⁺), es van observar bandes en les mateixes mostres en els enriquiments amb medi KMB⁺ però no en KB. No es va observar diferència en la intensitat de la banda visualitzada en el gel entre les amplificacions procedents dels enriquiments i les dels extractes.



Figura 2.15 Electroforesi amb gel d'agarosa dels productes amplificats per PCR amb els encebadors Phl2a i Phl2b de part de les mostres processades en el protocol B. Línia M, marcador 1 Kb DNA ladder; línies 0, controls negatius; línia 28 Control positiu; línies 1 a 27, mateix codi de les mostres de la taula 2.8 (Material i mètodes). S'observa una banda tènue a les mostres 6,7 i 8.

Figure 2.15 Agarose gel electrophoresis of the PCR products obtained with primers Phl2a and Phl2b from samples processed in protocol B. Lane M, 1 Kb DNA ladder; lanes 0, negative controls; lane 28, positive control; lanes 1 to 27, sample code as the samples in table 2.8 (Materials and methods). There are a low intensity fragment in samples 6,7 and 8.

Pel que fa referència al protocol A₂, es va observar una coloració marronosa en 13 de les plaques de KB. Cal remarcar que aquesta coloració no es corresponia ben bé al to vermellós que s'havia observat en les altres mostres anteriors analitzades amb aquest protocol. De les tres mostres que havien donat PCR positiu, solament es va observar aquesta coloració en una de les plaques. En aquestes 13 plaques es van realitzar aïllaments dirigits però no es va aconseguir cap resultat positiu per PCR. Curiosament, sí que es va observar que en les plaques repicades es tornava a produir una coloració marronosa semblant a l'observada en les plaques inicials i, ahora, en alguns dels aïllats es van obtenir 2 fragments amplificats en la PCR, un dels quals corresponia bastant amb la mida esperada de l'amplificació del gen *phlD* i un altre era de mida molt superior.

Hibridació en colònies

Un cop aconseguida la sonda marcada amb Dig-II-dUTP i després de procedir al càlcul de la producció obtinguda (25 ng/ μ L), es va realitzar a la realització d'un assaig previ emprant plaques de Petri sembrades amb *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ a diferents concentracions com a control positiu i una placa sembrada amb *P. fluorescens* SBW25 com a control negatiu (Figura 2.16).

La hibridació en colònies es va realitzar solament a partir dels glicerinatats corresponents als extractes i enriquiments en KMB⁺ de les mostres 6, 7 i 8. Amb la hibridació en colònies es van obtenir 2 colònies de les plaques corresponents als extractes de les mostres 6 i 8 que van hibridar amb la sonda. A continuació es va realitzar una PCR amb els aïllats de les colònies per confirmar la hibridació.

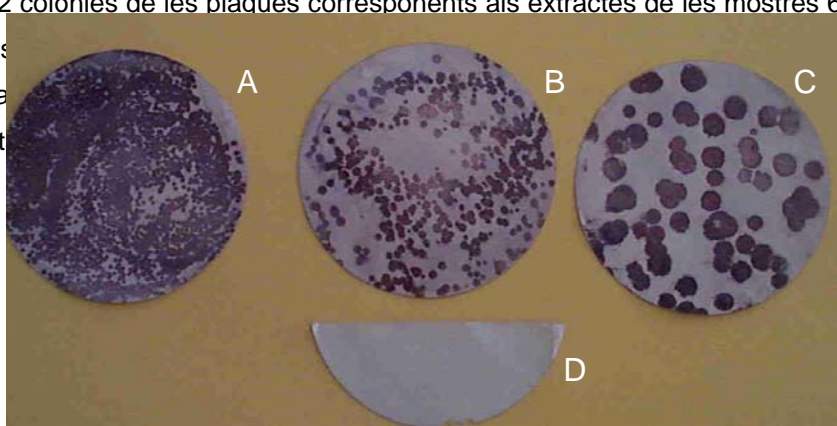


Figura 2.16 Hibridació en colònies amb la sonda *phlD* marcada amb digoxigenina-II-UTP en plaques de Petri sembrades amb diferents concentracions de *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ (A, B i C) i una placa sembrada amb *P. fluorescens* SBW25 (D, control negatiu).

Figure 2.16 Colony hybridization with the digoxigenin-II-dUTP labeled *phlD* probe in Petri dishes with different concentrations of *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ (A, B and C) compared to *P. fluorescens* SBW25 (D, negative control)

Restricció del gen *phlD* dels aïllats obtinguts amb els protocols A i B

Es van dur a terme les restriccions dels fragments amplificats amb la totalitat dels 14 aïllats portadors del gen *phlD* obtinguts amb els diferents protocols emprats (A i B). Les restriccions dels fragments amplificats amb l'enzim *Sal* I van mostrar que tots els aïllats tenien la diana de restricció per l'enzim, produint els fragments esperats de 562 i 164 pb. Amb l'enzim *Bsp* HI es va observar que solament l'aïllat 812 tenia les dues dianes de reconeixement, produint els tres fragments de 393, 221 i 132 pb; la resta de soques no va presentar una de les dianes de restricció produint, per tant, sols dos fragments de 613 i 132 pb (Figura 2.17).

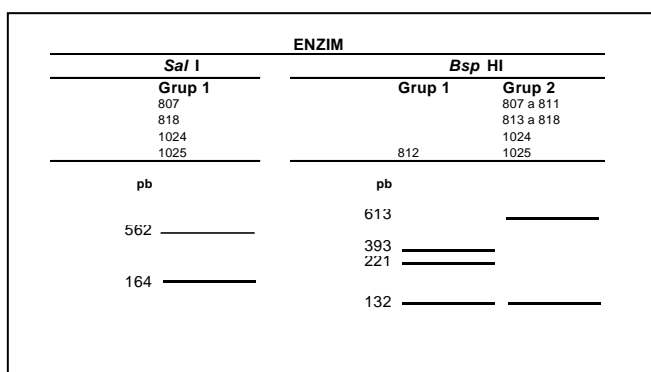


Figura 2.17 Patrons de bandes de RFLP dels amplificats dels gens *phlD* dels aïllats 807-818 i 1024-1025, emprant dos enzims de restricció.

Figure 2.17 RFLP banding patterns of amplified *phlD* genes from isolates 807-818 and 1024-1025 using two restriction enzymes.

2.4 Discussió

En l'actualitat i entre els bacteris que pertanyen al grup fluorescent del gènere *Pseudomonas*, el mecanisme (o un dels mecanismes) més important en el biocontrol ha estat l'antibiosi. Entre els antibiòtics dels que s'ha demostrat la importància i implicació en el biocontrol cal destacar el 2,4-diacetilfloroglucinol, l'àcid fenazin-1-carboxílic i la pirrolnitrina. Per aquest motiu, es va considerar necessari per a la realització de la resta d'aquest treball de Tesi de disposar d'aïllats bacterians entre la nostra col·lecció que fossin portadors dels gens biosintètics per a la producció d'aquests antibiòtics. Tot i disposar de soques productores dels diferents antibiòtics (cedides per altres investigadors), es important tenir entre la pròpia col·lecció aïllats capaços de produir-los i seleccionats dels ambients on es volen introduir, com és el nostre cas en el biocontrol de les malalties de fruiters. En aquest sentit, el treball realitzat en aquest capítol va ser un pas previ de l'objectiu principal del treball consistent en la realització d'una anàlisi polifàsica d'un conjunt de soques de *P. fluorescens*.

2.4.1 Aïllament de bacteris epífits

Després del processament de les mostres i obtenció de cultius purs, no es va procedir immediatament a una identificació exhaustiva dels aïllats; solament es va tenir en compte la fluorescència sota llum ultraviolada de les colònies crescudes en agar KB i el fet de ser Gram negatives i oxidasa positives. Del total dels 406 aïllats obtinguts, 225 van ser oxidasa negatius i, per tant, presumptius *P. syringae*. Les mostres es van obtenir de plantes ornamentals i fruiters (sobretot perera i pomera) durant el període vegetatiu (primavera i estiu); per tant, no és d'estranyar l'obtenció d'un elevat nombre d'aïllats fluorescents i oxidasa negatius al ser *P. syringae* un bacteri epífit del que s'han descrit més de 80 espècies de plantes hoste (Hirano i Upper 2000) i sobretot en fruiters com la perera on ha estat associada la seva presència amb la malaltia de la necrosi de borrons de flor (Montesinos i Vilardell 1988).

2.4.2 Disseny d'uns encebadors per a la detecció dels gens biosintètics de la pirrolnitrina (Prn)

La disponibilitat de la seqüència dels gens implicats en la biosíntesi de la pirrolnitrina va fer possible el disseny d'uns encebadors per detectar els bacteris portadors del gens com a productors potencials de pirrolnitrina. Fins al moment hi ha disponible la seqüència d'una sola soca productora, la *P. fluorescens* BI915 (Hammer i col. 1997).

La hipòtesi més acceptada de la disposició dels diferents gens que codifiquen pel enzims necessaris en la seva síntesi, igual que en el cas del PhI, PCA i Prn, és que els gens que codifiquen pels enzims implicats en la ruta de biosíntesi es troben distribuïts seqüencialment al llarg de l'operó. Per aquest motiu es va escollir per al disseny dels encebadors l'últim enzim que està implicat en la síntesi de Prn. Un cop obtinguts amb el programa informàtic diferents parells d'encebadors es va escollir el parell que semblava més adient per a la detecció tenint en compte els paràmetres del programa del termociclador utilitzat per amplificar els gens de PhI i PCA i que la longitud del fragment amplificat fos semblant als obtinguts amb els del PhI i PCA. Aquest mètode de selecció dels encebadors havia de permetre la realització d'una PCR conjunta; així, en el moment de fer la prospecció, es podrien processar les mostres amb cada un dels tres encebadors en el mateix programa del termociclador i visualitzar els resultats en el mateix gel. Quan es tracta del disseny d'encebadors, l'objectiu rau en obtenir un compromís entre l'especificitat i l'eficiència de l'amplificació (Dieffenbach i col. 1993, Louws i col. 1999). L'especificitat es defineix com la capacitat d'obtenir amplificats solament de la seqüència d'interès mentre que la sensibilitat fa referència al nombre de còpies de la seqüència necessàries per a ser detectat. En el nostre cas, al voler emprar els encebadors en cultius purs, la sensibilitat no era un factor important, però sí que era interessant que fos específic.

En el moment de provar els encebadors escollits, només disposàvem de les soques *P. fluorescens* BL915 i CHA0 per determinar l'especificitat i, per això, a l'obtenir el fragment amplificat en ambdós casos es va decidir utilitzar-lo amb la resta d'aïllats i soques emprades en el treball. En el moment de la realització d'aquesta part del treball no s'havien descrit encebadors per a la detecció dels gens biosintètics de la pirrolnitrina. Mavrodi i col. (2001) han estat els primers de publicar uns encebadors de la Prn; aquests autors van escollir per al disseny el gen *prnC* que codifica per una halogenasa que catalitza la cloració de monodecloramopirrolnitrina a aminopirrolnitrina i, per tant l'enzim anterior al que vàrem escollir nosaltres (*prnD*). PrnC és una halogenasa amb molta similitud de seqüència peptídica amb tres halogenases que intervenen en la biosíntesis de la Plt (Nowak-Thomson i col. 1999). La mida del fragment obtingut amb aquests nous encebadors és de 719 pb, per tant també permet emprar en un mateix gel l'anàlisi dels amplificats de PCA i PhI, però el programa del termociclador utilitzat és diferent al que empen els mateixos autors per la detecció dels gens del PhI i PCA, de manera que s'ha de realitzar en diferents PCRs, mentre que en el nostre cas es fa simultàneament.

La cerca mitjançant el programa BLAST de seqüències homòlogues als encebadors, dipositades en el GenBank, va mostrar que Prna i Prnb solament tenen un 100% de similitud en les 5 darreres bases en l'extrem 3' en una seqüència procedent de *Metharizium anisopliae* (Prna) i de *Homo sapiens* (Prnb), resultant per tant poc probable la unió i possible amplificació de seqüències no diana. En el cas de l'encebador PhI2A, descrit per Raaijmakers i col. (1997) són moltes més les seqüències que es poden trobar amb aquestes característiques procedents d'*Arabidopsis thaliana*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Deinococcus radiodurans*, *Streptomyces coelicolor* i *Homo sapiens*.

2.4.3. Detecció de la presència dels gens biosintètics dels antibiòtics 2,4-diacetilfloroglucinol (Phl), àcid fenzin-1-carboxílic (PCA) i Pirrolnitrina (Prn) en una col·lecció d'aïllats de *Pseudomonas* (sensu stricto)

La recerca de bacteris del grup fluorescent de *Pseudomonas* potencialment productors dels diferents antibiòtics s'ha portat a terme en aquest treball mitjançant l'ús de marcadors moleculars amb la tècnica de la PCR. Per tant, s'ha emprat una aproximació genètica per determinar l'habilitat de producció dels diferents metabòlits i no una anàlisi directa dels metabòlits. L'ús d'aquesta tècnica, emprant com a marcadors moleculars els gens biosintètics necessaris per a la seva producció, havia de permetre una primera selecció ràpida d'aïllats portadors dels gens biosintètics implicats en la producció de l'antibiòtic. El temps necessari per realitzar l'extracció i identificació de l'antibiòtic és molt superior al temps necessari per a la realització d'una PCR i, de fet, si l'aïllat no és portador dels gens no pot produir-lo. Paral·lelament també s'ha demostrat que l'expressió dels gens està modulada per factors biòtics i abiòtics (Duffy i Défago 1999, Alemany 2001, Mavrodi i col. 2001). Per tant, es podria donar el cas de que el protocol utilitzat per a l'extracció del metabòlit (per exemple el medi de cultiu escollit) donés un resultat negatiu de producció. En canvi si per PCR es detecta que l'aïllat és portador dels gens, poden realitzar-se diferents protocols per confirmar la producció. En el treball realitzat per Mavrodi i col. (2001) es van emprar 30 soques portadores dels gens de Phl, algunes d'elles ben referenciades com a productores de Phl com *P. fluorescens* CHA0 i Pf-5. Però aquests autors no van detectar la producció de Phl sota les condicions del seu assaig en 6 de les soques on es trobaven incloses la CHA0 i la Pf5. Malgrat tot, amb el coneixement de la regulació de l'expressió d'aquests gens que es té actualment, pot succeir també que l'aïllat portador dels gens sigui incapaç de produir-lo per mutacions en els mateixos gens biosintètics (insercions i/o delecions) o en els gens reguladors que hi estan implicats (Duffy i Défago 1995, De Biasio i col. 2000).

Un altre avantatge de la PCR rau en el fet de que amb el protocol emprat en el nostre treball els aïllats poden ser processats alhora simultàniament per la detecció dels gens biosintètics dels tres antibiòtics (Phl, PCA i Prn), mentre que els protocols d'extracció i caracterització química dels antibiòtics són diferents en cada un dels casos.

No hi ha treballs en els que s'hagi portat a terme la selecció de possibles agents de biocontrol mitjançant l'ús d'aquests marcadors moleculars relacionats amb la producció d'antibiòtics. Els treballs on s'ha utilitzat la tècnica de la PCR per detectar si un aïllat és potencialment productor del metabòlit (dit d'una altra manera, si es portador dels gens biosintètics) han estat majoritàriament dirigits al floroglucinol i quasi sempre en estudis en sols supressius del "Take-All" del blat (Raaijmakers i col. 1997, Raaijmakers i Weller 1998, Raaijmakers i col. 1999a i 1999b) o en experiments de laboratori en cambres d'ambient controlat (McSpadden i col. 2000, Picard i col. 2000). Quant a la detecció de soques amb gens implicats en la biosíntesi de PCA, no hi ha

referències bibliogràfiques fins al moment on s'hagin emprat els encebadors dissenyats per Raaijmakers i col. al 1997. Aquest fet podria estar motivat per dues causes principals: (1) no s'ha demostrat una clara relació entre la densitat dels productors i la supressió d'una malaltia (a diferència del floroglucinol), i (2) perquè l'especificitat dels encebadors disponibles no és total ja que a més de detectar els productors de PCA, es pot obtenir també un fragment de la mateixa mida en soques productores d'altres fenazines com la clororanfina (Raaijmakers i col. 1997). Pel que fa referència a la Prn, si que s'ha emprat recentment aquesta aproximació, però dirigida solament a l'estudi de la freqüència de portadors dels gens de la Prn entre els portadors del gen *phlD* (Mavrodi i col. 2001).

La major part de soques productores dels antibiòtics Phl, PCA i Prn, cedides per altres investigadors, han estat aïllades de les arrels. En el nostre cas era interessant processar majoritàriament mostres de la part aèria, principalment de fruiters, del sistema on ens interessava obtenir potencials productors, però, també es van processar mostres d'arrels (de portaempelts de fruiters) per disposar de mostres que poguessin donar un resultat positiu amb algun dels encebadors.

En la prospecció dels diferents gens implicats en la biosíntesi dels metabòlits PCA, Prn i Phl, en la col·lecció de 418 aïllats, solament s'han obtingut 7 que amplifiquessin amb algun dels encebadors. En concret, 4 amb els encebadors de PCA, 3 amb els de Phl i 1 amb els de la Prn (aïllat que també va ser positiu amb PCA).

A excepció d'un (el 1019) la resta d'aïllats positius amb els encebadors del Phl provenen d'arrel, resultat que concorda amb l'origen de quasi totes les soques productores del metabòlit com les típiques soques *P. fluorescens* CHA0 i Q₂₋₈₇. Podria haver-hi dues raons que expliquessin aquest fet: (1) que no s'han realitzat prospeccions d'un nombre suficient d'aïllats procedents de la part aèria de les plantes, i (2) que realment la producció d'aquest metabòlit no sigui un avantatge important pels bacteris residents a la part aèria dels vegetals i, per tant, sigui un tret més característic dels rizobacteris.

Contràriament, dels 4 aïllats positius amb els encebadors de PCA, 3 provenen de la part aèria i solament 1 (EPS263) del sistema radical que al mateix temps és l'únic que dóna positiu també amb la Prn. El treball recent portat a terme per Mavrodi i col. (2001) va avaluar la presència conjunta dels gens biosintètics per a la producció de Phl i Prn en 30 soques portadores del gens de Phl. Sorprenentment, solament tres de les soques (ja referenciades pels obtentors com a productores de pirrolnitrina) van mostrar la presència d'ambdós gens. Aquest resultat evidencia que la distribució dels gens de la Prn en els productors de Phl és molt limitada i es podria extrapolar a la resta d'aïllats bacterians.

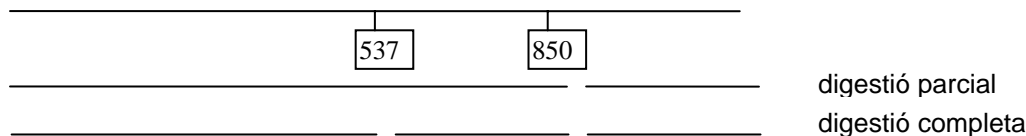
Pel que fa referència a les soques cedides per altres investigadors, en la majoria, els nostres resultats concorden amb la producció de metabòlits referenciats en els casos de *P. fluorescens* Q₂₋₈₇, Q₄₋₈₇, Ps15, Ps31, 2-79, BL915 i *Pseudomonas* sp. JBR1-70 i JMP12-84. En canvi, les soques *P. fluorescens* WB1 i WB52 que havien estat demanades perquè segons els seus obtentors produïen àcid salicílic (Fakhouri i Buchenauer 1998), i es desconeixia si produïen o no altres metabòlits van donar positives amb l'amplificació amb els gens de Phl i Prn. En el cas de la soca *P. fluorescens* CHA0, la producció d'aquest antibiòtic ja havia estat descrita per Duffy i Défago (1997), quan la soca creix en presència de manitol i fructosa, tot i que les concentracions obtingues són inferiors que les d'altres soques també referenciades com a productores. La baixa producció de Prn per part de *P. fluorescens* CHA0 sembla que pot reflectir la competició pel precursor L-triptòfan, que també forma part de la ruta de biosíntesis en la producció d'àcid indolacètic (IAA) produït per la mateixa soca. En conclusió, el resultat obtingut amb els encebadors de la Prn dissenyats en el nostre treball concorda bé amb la producció de pirrolnitrina descrita en la soca CHA0.

Un dels mètodes més utilitzat i senzill per comprovar la identitat d'un amplificat en la PCR és, sens dubte, la restricció del fragment obtingut en l'amplificació. Altres metodologies que és poden utilitzar són la seqüenciació del fragment o l'ús d'una hemi-nested o una nested PCR emprant el producte de la primera amplificació. Aquests mètodes, però, són laboriosos i en el cas de la nested o hemi-nested s'han de dissenyar nous encebadors (1 en el cas de l'hemi-nested i 2 en el cas de la nested), cal la realització d'una nova PCR i, a més, s'ha de tenir molta cura en les manipulacions pel risc que representen les contaminacions que es poden produir al posar com a mostra un amplificat de PCR. En el present treball es va escollir per avaluar la identitat del fragment amplificat la realització de digestions dels amplificats amb dos enzims de restricció i, a més, es podia obtenir informació sobre el possible polimorfisme en la seqüència.

Els amplificats obtinguts amb dos dels tres encebadors emprats mostren la divisió dels amplificats en diferents agrupacions. Pel que fa a la pirrolnitrina, qualsevol dels dos enzims escollits (*Bsp* HI i *Bgl* I) per a la digestió és adequat per confirmar la identitat del gen; n'obstant, cal pensar que solament s'ha disposat de 5 soques portadores dels gens i, per tant, potser no és suficientment representatiu. En el cas dels fragments amplificats amb els encebadors del Phl, i per cada un dels enzims, (*Sal* I – *Bsp* HI) s'observa la distribució de les soques en dos grups. Amb l'excepció de l'aïllat 1016, els dos grups de soques correlacionen bé, la manca de la diana per l'enzim *Sal* I es relaciona també la pèrdua d'una de les dues dianes de l'enzim *Bsp* HI. La divisió dels aïllats portadors del gen *phlD* en grups diferenciats detecta l'existència de polimorfismes en la seva seqüència que seran estudiats en el Capítol 4.

Quant a les digestions dels amplificats obtinguts amb els encebadors de la PCA, els amplificats es van distribuir en 3 grups amb l'ús de l'enzim *Bgl* I i en 2 amb l' *Eco* RV. Amb aquest darrer enzim la separació en els dos grups residia en l'absència o presència de la diana de restricció. En canvi, amb l'enzim *Bgl* I els amplificats mostren diferents patrons, possiblement degut a que la diana de

reconeixement és la seqüència GCC(N₄)/NGGC. En aquest cas és, però, s'observa la presència d'un fragment de la mida de 850 pb en els aïllats 894 i 895. Aquest patró podria tenir lloc si les dianes de restricció de l'amplificat seguissin el següent esquema:



L'objectiu de l'anàlisi dels patrons de restricció amb els enzims estava encaminat a demostrar la identitat del fragment amplificat amb un mètode senzill. Però els resultats obtinguts amb els enzims escollits en el cas de Phl i PCA mostren l'existència de polimorfismes en la seqüència dels gens en les diferents soques. Aquest fet implica la necessitat de disposar de més seqüències corresponents a cada un dels gens, de manera que la tria dels enzims tingui en compte les zones més conservades dels gens presents en diferents aïllats. En el present treball no s'ha incidit en la recerca dels motius pels quals s'obtenen diferents productes en la restricció dels amplificats amb els gens de la PCA però si pel cas del floroglucinol que s'estudia en detall en el capítol 4. La poca disponibilitat de soques portadores del gen de PCA no ha permès l'estudi de la diversitat o heterogeneïtat de la seqüència en soques aïllades de diferents orígens geogràfics i plantes hoste.

2.4.4 Avaluació d'estratègies per a la detecció de bacteris productors potencials dels antibiòtics floroglucinol (Phl) i àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) en mostres naturals

La recerca de bacteris portadors dels gens biosintètics necessaris per a la producció dels antibiòtics Phl, PCA i Prn a partir de l'aïllament de bacteris fluorescents del gènere *Pseudomonas* i de la posterior detecció dels gens corresponents per PCR, portada a terme en l'apartat anterior, es va mostrar poc productiva, però en cap cas es pot considerar una metodologia errònia. De fet, és possible que l'abundància de bacteris amb aquestes característiques en els tipus de mostra escollits sigui baixa. Per aquest motiu es va decidir avaluar diferents sistemes de detecció i recerca d'aïllats productors d'aquests antibiòtics basats en marcadors fenotípics que estiguin relacionats amb la producció de PCA i Phl.

La utilització de la producció dels pigments característics relacionats amb les fenazines com a marcador fenotípic, no va ser possible perquè la diferenciació de la coloració dels cultius de soques productores i no productores de referència va ser molt subjectiva. De fet, Palleroni al 1984 ja va citar el fet de que la producció de pigments per bacteris productors de fenazines en agar King A no sempre s'observa. Freqüentment, la producció del pigment sembla ser erràtica, sobretot en cultius que s'han mantingut en condicions de laboratori durant períodes de temps llargs.

Contràriament, la producció del pigment vermellós en el cas de soques productores de floroglucinol és un bon marcador fenotípic, identificable i consistent, en les soques productores de referència, tal com van apuntar Keel i col. (1996). Un altre avantatge en l'ús del marcador fenotípic del floroglucinol, és la detecció de la producció d'aquest antibiòtic en altres soques que no pertanyin al grup de *Pseudomonas*. Fins al treball de Picard i col. (2000), on es descriu per primer cop la producció de PhI per un aïllat del gènere *Enterobacter*, solament s'havien descrit aïllats del gènere *Pseudomonas* com a productors de floroglucinol. Aquest descobriment indica que la producció de PhI no està restringida al gènere *Pseudomonas*; Picard i col. (2000) apunten la possibilitat de la transferència horitzontal dels gens, des d'aquest gènere a altres gèneres bacterians. Un fet que dóna suport a aquesta hipòtesi rau en que l'homologia en la seqüència del gen *phlD* d'aquest aïllat d'*Enterobacter* i els d'aïllats del gènere és molt elevada (99.8% d'identitat).

Mitjançant l'ús del Protocol A₁, que es basava en un primer aïllament de bacteris fluorescents en agar KB, Gram negatius i oxidasa positius per a la detecció del gen *phlD* mitjançant PCR, no es va detectar cap aïllat portador del gen. Tanmateix, amb la utilització del protocol A₂ que es basava en la incubació perllongada de les plaques i posterior aïllament dirigit de les colònies gràcies a l'ús del marcador fenotípic, es van aconseguir 12 aïllats portadors del *phlD*. L'explicació d'aquesta diferència pot raure en el fet de que els aïllats emprats per la PCR eren escollits a l'atzar a partir de les colònies fluorescents i repicats de la placa original a les 24-48 hores de la incubació i, en canvi, els portadors dels gens que es van aïllar presenten un creixement molt més lent en placa que la majoria d'altres aïllats fluorescents i que eren detectats només després d'una llarga incubació (protocol A₂). Les mostres de les que es van aïllar aquests 12 *phlD*⁺ procedien la gran majoria de la part radicular de portaempelts de fruiters d'un viver comercial, en concordança amb l'origen de la major part de soques productores de PhI referenciades a la bibliografia (Défago i Haas 1990, Keel i col. 1996, Nielsen i col. 1998, McSpadden i col. 2000, Picard i col. 2000).

El protocol A₂ va permetre la identificació d'un grup concret de mostres que contenien productors potencials de PhI i a partir de la identificació d'aquest grup de mostres es va dissenyar un nou protocol B basat en l'ús de la PCR com a mètode per a la realització d'una anàlisi més ràpida per detectar bacteris portadors del gen *phlD* en mostres naturals. Raaijmakers i col. al 1997 ja apuntaven l'ús d'aquesta metodologia, però fins al 2001, no s'havia publicat cap referència que l'utilitzés.

En tots els treballs descrits fins el 2001 amb bacteris portadors del gen *phlD*, sols s'havia emprat la hibridació en colònies per a la detecció dels aïllats i la PCR s'havia utilitzat com a mètode confirmatiu, més com a prova qualitativa de la hibridació que no com a mètode directe (Raaijmakers i col. 1997, 1999, Raaijmakers i Weller 1997, Picard i col. 2000, McSpadden i col. 2000). Possiblement, aquest fet es deu a que els sistemes en que aquests autors treballen ja presenten una població natural de soques portadores dels gens, al tractar-se la major part de vegades de sòls supressius del "Take-all decline" del blat. En les seves circumstàncies és entenedor que sigui preferible l'ús de la hibridació, ja que permet directament l'aïllament dels

portadors. En el nostre cas, l'absència de sòls supressors coneguts, fa preferible l'ús de les dues tècniques però en un ordre diferent, és a dir, realitzar la hibridació en colònies quan ja es coneix la presència de portadors del gen. Les causes del canvi d'ordre són essencialment pràctiques: la hibridació en colònies és econòmicament costosa i, a més, és molt laboriosa si hom no està segur de poder obtenir bons resultats. En el cas de la PCR, cal la realització d'una extracció de DNA de les mostres i garantir la conservació dels extractes de la mostra original amb ultracongelació en glicerol perquè en cas d'un resultat positiu amb la PCR, es pugui retornar als extractes de la mostra original i aplicar-se la hibridació en colònies.

Recentment, però, McSpadden i col. (2001) també han desenvolupat un assaig basat en la PCR per a la detecció del gen *phlD* per tal de caracteritzar la presència, abundància i diversitat dels bacteris portadors del gen presents a la rizosfera. El mètode desenvolupat per aquests autors presenta algunes diferències amb el protocol B emprat en el nostre treball. En primer lloc, amb el protocol B es pretén solament la identificació de la presència de bacteris *phlD*⁺, directament dels extractes vegetals de les mostres (B₁) i després d'un enriquiment previ en els medis KB i KBM⁺ (B₂), realitzant una extracció de DNA abans de la realització de la PCR. Quan es tracta de realitzar PCR en extractes vegetals, l'amplificació directa d'aquest extracte no és suficient degut a l'existència de factors que inhibeixen l'amplificació dels àcids nucleics, com pot ser la presència de compostos inhibidors de la reacció i altres components que poden unir-se al DNA (Wilson, I.J. 1997, Llop i col. 1999). El protocol que es va escollir per a l'extracció del DNA és el citat per Llop i col (1999), al ser una extracció simple on no hi ha molts passos i, a més, no calen reactius tòxics com en les extraccions basades en el mètode del fenol-cloroform. McSpadden i col. (2001) no realitzen una extracció prèvia del DNA dels extractes sinó que fan dilucions successives de les mostres i posteriorment procedeixen a la realització d'un enriquiment en KBM⁺ (diluït 1/3) de cada una de les dilucions. Un cop passades les 48 hores d'incubació mesuren l'absorbància del cultiu enriquit i, en cas de ser positiva, passen a la realització d'una PCR directament del cultiu (en el cas de les primeres dilucions, els autors citen que normalment s'observa una inhibició en les dues primeres dilucions). En segon lloc, la seva estratègia és alhora quantitativa; l'observació del creixement en els enriquiments de les dilucions successives juntament amb la detecció simultànea del gen *phlD* per PCR permet, tenint en compte les dilucions que han realitzat, mesurar l'abundància de bacteris *phlD*⁺ presents en la mostra inicial.

Un cop es va identificar en el nostre treball un sistema on es van aïllar portadors del gen *phlD*, es va realitzar el protocol B, amb l'objectiu d'avaluar l'eficiència de l'ús de la PCR com a mètode directe. Paral·lelament i per poder comparar l'efectivitat d'aquesta metodologia, es va realitzar amb les mateixes mostres el protocol A₂ d'aïllament dirigit amb el marcador fenotípic.

Com a treball preliminar, calia determinar la sensibilitat dels encebadors, tant en cultiu pur com en extractes de mostres inoculades artificialment. Els resultats obtinguts en cultiu pur concorden amb els descrits per Raaijmakers i col. (1997), en que el límit de detecció per DNA genòmic purificat

era de 1 pg amb els encebadors de PhI i 10 pg amb els de PCA en el tub de reacció de PCR. Si 1 pg de DNA purificat equival més o menys a 10^2 ufc (Bereswill i col. 1992), la concentració de la mostra ha de trobar-se al voltant de 10^4 ufc /mL. En el nostre treball s'obté una banda molt tènue però que és clarament visible en el tub de 10^3 ufc /mL, fet que podria ser el resultat de que la concentració real de la mostra fos una mica superior a l'obtinguda en el recompte, per la presència de viables i no cultivables (Troxler 1997b, Mascher i col. 2000, Grey i Steck 2001). A primer cop d'ull pot semblar que aquesta sensibilitat és insuficient, però s'ha de tenir en compte que la major part de reaccions de PCR on el límit de sensibilitat dels encebadors és inferior o igual a 10^2 ufc en el tub de reacció es basen en dianes de fragments de DNA que estan: (1) codificades en plasmidis presents en varies còpies com el cas dels encebadors pel plasmidi pEA29 d'*Erwinia amylovora* (Bereswill i col. 1992) que sembla ser es troba en un nombre de 3 còpies per cèl·lula, o (2) amb encebadors dirigits a operons repetits en el cromosoma bacterià, que seria el cas dels encebadors d'*E. amylovora* dissenyats per amplificar una part del rDNA 23S (Maes i col. 1996).

En contrast, quan es tracta de dianes cromosòmiques, el límit de detecció augmenta ostensiblement disminuint la sensibilitat dels encebadors. Poussier i Luisetti (2000) opinen que quan hi ha una sola diana en el cromosoma, el límit de detecció sol estar al voltant de 10^5 ufc/mL. En el cas de la detecció del bacteri fitopatogen *E. amylovora*, utilitzant uns encebadors dirigits als gens cromosòmics *ams* (involucrats en la síntesi de l'amilovorina) s'ha observat la disminució de la sensibilitat d'almenys una potència de 10 enfront els dirigits als plasmidis (Bereswill i col. 1995). Aquesta variació en la sensibilitat, però, no significa un augment d'una potència de 10 en el nombre de dianes; per exemple en *E. amylovora* es passa de tenir una sensibilitat de 50 cèl·lules en el tub de reacció emprant els encebadors del plasmidi (50 cèl. x 3 plasmidis = 150 dianes) enfront de 500 cèl·lules en el cas dels cromosòmics (500 dianes). Per tant, la sensibilitat en el nombre de dianes augmenta al voltant de 3 vegades. En el cas dels gens biosintètics del floriglucinol no es coneix el nombre de còpies per cèl·lula i, per les característiques de la seva regulació, semblaria molt probable que hi hagués solament una còpia en cada genoma.

Els resultats obtinguts per nosaltres concorden també amb els descrits per McSpadden i col. (2001), malgrat que van portar a terme un assaig de sensibilitat diferent i també van emprar altres encebadors. Aquests autors van dissenyar uns nous encebadors dins la seqüència amplificada per els dissenyats per Raaijmakers i col. (1997); la mida del fragment amplificat és en el seu cas de 629 pb enfront els 745 dels emprats en el nostre treball. L'assaig el van realitzar amb cultius de bacteris *phID*⁺ en presència de bacteris *phID*⁻, obtenint una sensibilitat com la nostra. Al ser encebadors dins el mateix gen, és normal que els resultats de sensibilitat siguin semblants, doncs l'accessibilitat al DNA i el nombre de dianes continuen sent els mateixos amb els dos encebadors.

En el cas dels encebadors de la PCA, la sensibilitat és inferior als de PhI potser degut a altres factors, com l'accessibilitat al DNA diana. Al no poder emprar el marcador fenotípic per portar a

terme la recerca d'un nombre suficient d'aïllats que continguessin el gen, tampoc s'ha aprofundit en aquest aspecte.

Per altra banda, els resultats que hem obtingut en els extractes vegetals de la part aèria, que mostren la disminució de la sensibilitat dels encebadors, han estat també descrits per varis autors que treballen en la detecció de bacteris fitopatògens de la part aèria (Bereswill i col. 1992, Llop i col. 2000). En el cas de les arrels, l'augment de les dianes que han d'estar presents en el tub de reacció per obtenir una amplificació, és superior i així mateix, la completa inhibició en el cas dels sòls també ha estat citada en nombrosos estudis treballant amb *P. cepacia* i *P. fluorescens* (Wilson I.J. 1997, Cullen i Hirsch 1998). En la majoria de sòls no és suficient una extracció tan simple com l'emprada en el nostre treball ja que la presència d'àcids húmics dificulta enormement la detecció per PCR i cal la utilització de precol-lumnes de neteja de la mostra abans de procedir a una extracció de DNA.

Malauradament, no podem comparar els nostres resultats obtinguts en els diferents extractes amb els de McSpadden i col. (2001) que, com s'ha comentat anteriorment, realitzen una aproximació diferent i, per tant, no són comparables.

En el protocol B es va incloure també una etapa d'enriquiment previ de les mostres (protocol B₂); aquesta estratègia ha estat i està àmpliament emprada en la detecció de bacteris fitopatògens, tant pel posterior anàlisis per PCR com per altres tècniques immunològiques com l'ELISA (Schaad i col. 1995, Gorris i col. 1996, Penyalver i col. 2000, McSpadden i col. 2001). L'èxit d'aquesta etapa ha estat variable dependent del cas. En tot cas l'avantatge d'aquesta estratègia rau en que es proporcionin les condicions adequades per al desenvolupament del bacteri que es vol enriquir envers la resta de la microbiota present. Per això, en el nostre cas, és va emprar el medi B de King que, al ser pobre en ferro, permet millor el desenvolupament de bacteris capaços de produir sideròfors, així com l'addició d'antibiòtics (KMB⁺) de manera que fos més selectiu per al desenvolupament dels membres del gènere *Pseudomonas*. En ambdós casos, amb enriquiment en KB i KMB⁺, no es van aconseguir millors resultats que en l'extracte sense l'enriquiment. Aquest fet podria ser degut a que els aïllats portadors dels gens presents en la mostra presentin un temps de duplicació més elevat que la resta d'aïllats no portadors, que estaria amb concordança amb el que s'havia observat en l'ús del protocol A, on els aïllats portadors del gen *phlD*, presentaven un creixement més lent en placa que la major part d'aïllats no portadors. En aquest sentit, seria interessant cercar substrats que poguessin ser metabolitzats solament (o amb major eficiència) pels bacteris portadors del gen enfront la resta de la microbiota present en les mostres. Actualment hi ha autors que treballen en els estudis de la diversitat fenotípica de les soques portadores del gen, amb la realització dels perfils d'utilització de substrats com el Biolog per intentar definir si hi ha diferències entre les productores de Phl enfront la resta de soques no productores (McSpadden i col. 2000).

Comparant el protocol B amb el protocol A per les mateixes mostres, hem posat de manifest la importància de l'ús de la PCR com a mètode de detecció prèvi i comprovació de la presència dels gens biosintètics abans de la realització d'aïllaments. Si bé aquest protocol és també laboriós al haver de guardar els glicerins de les mostres ultracongelats per al posterior aïllament, té l'avantatge de que evita la sembra i manipulació de molts cultius i plaques.

Perquè la tècnica de la PCR es pugui emprar com a mètode directe per a la detecció de bacteris portadors del gen, cal disposar de noves estratègies per tal d'augmentar la sensibilitat i millorar l'extracció de DNA en els extractes vegetals (sobretot pel que fa als extractes de les arrels). La sensibilitat de la tècnica de la PCR pot ser millorada amb l'ús de Nested-PCR, és a dir, amb la realització d'una segona amplificació amb uns encebadors interns a la diana utilitzada en una reacció prèvia de PCR (emprant els encebadors externs). Aquesta tècnica ha estat utilitzada en la detecció de patògens com per exemple *E. amylovora* (McManus i Jones 1995, Llop i col. 2000), *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Schaad i col. 1995), *P. solanacearum* (Poussier i Luisetti 2000), i *Xanthomonas fragariae* (Roberts i col. 1996). La Nested-PCR es pot realitzar en dues reaccions de PCR independents i, per tant, en dos tubs, però és preferible l'ús de la Nested-PCR en un sol tub que evita el problema de contaminació que suposa el processament de les mostres procedents d'una primera reacció per la realització de la segona ronda de PCR. Amb el disseny dels nous encebadors per McSapadden i col. (2001) que amplifiquen dins el fragment obtingut amb els de Raijmakers i col. (1997), no seria possible l'ús d'una Nested-PCR en un sol tub perquè la temperatura d'anellament dels dos parells d'encebadors és semblant, però sí que es podria realitzar una Nested-PCR en dos reaccions independents.

El fet que en les mostres emprades en el nostre treball per a la comparació entre els protocols A i B no s'hagi obtingut tan bon resultat com en les mostres processades solament amb el protocol A, sembla degut a la baixa presència de bacteris portadors del gen en les segones mostres. Possiblement aquest fet es degut a les característiques de les plantes que es van prendre com a mostres, ja que varis treballs han mostrat que la composició dels exsudats de l'arrel és la que selecciona la microbiota present i aquests exsudats depenen de l'estat fenològic i l'edat del portaempelts (Nielsen i col. 1998, Picard i col. 2000).

En conclusió, sembla que el millor protocol per emprar en la recerca d'aïllats productors potencials de floroglucinol en les nostres contrades és l'ús del protocol A. Al no disposar de sistemes on ja es coneix prèviament la presència de bacteris portadors del gen (com el cas de sòls supressius), aquest sembla el protocol més ràpid, menys laboriós, econòmicament més rendible i amb bons resultats, enfront la utilització de la PCR o la hibridació en colònies en una primera etapa. Altrament, en el cas de disposar de sistemes on ja es coneix la presència de portadors del gen, la hibridació en colònies sembla ser la tècnica més adient ja que permet aïllar directament les colònies portadores per a anàlisis futures.

Malauradament, els resultats en el cas de la PCA la producció dels pigments característics de les fenazines no ha mostrat ser un mètode suficientment vàlid per permetre una discriminació entre soques productores i no productores. En el cas de la Prn, al no disposar tampoc de cap marcador fenotípic, no s'han pogut comparar els resultats dels diferents protocols. Així, en aquests dos darrers casos (PCA i Prn) sols s'ha realitzat la cerca de bacteris portadors dels gens mitjançant PCR.

Capítol 3: Caracterització fenotípica

3.1 Introducció

En el capítol que es descriurà a continuació, s'ha treballat amb un conjunt d'aïllats, seleccionats d'altres treballs portats a terme en el nostre grup de recerca, d'aïllats propis citats en el capítol anterior que són portadors de gens biosintètics per a la producció de metabòlits importants en el biocontrol, així com de soques de referència obtingudes de col·leccions de cultius o cedides per altres investigadors. S'ha realitzat una caracterització fenotípica de la producció de metabòlits, antagonisme *in vitro*, capacitat de promoure el creixement en plantes (BPCP) i de biocontrol (ACB), així com a nivell d'identificació d'espècie.

El gènere *Pseudomonas* és objecte d'un gran interès per tractar-se de bacteris amb un elevat nombre de soques que han mostrat aptituds com a agents de biocontrol o promotors del creixement en plantes. La detecció i avaluació de bacteris antagonistes que puguin ser emprats com a agents de biocontrol és una tasca difícil i que la majoria de vegades es conclou sense assolir l'objectiu plantejat. Si bé la primera selecció sol realitzar-se amb un gran nombre d'aïllats procedents d'assaigs d'antagonisme *in vitro*, aquests solen revelar solament la capacitat del bacteri per produir metabòlits amb activitat antibiòtica. Per aquest motiu i per a una avaluació més real, també s'ha proposat la realització de bioassaigs d'inhibició de la infecció causada per patògens i en els que es poden posar de manifest altres mecanismes d'acció com l'exclusió i la competició per nutrients. Per tot el citat anteriorment és important la realització d'una caracterització fenotípica el més acurada possible que serà bàsica per a interaccionar característiques com l'espècie bacteriana, la producció de metabòlits i la seva actuació com a BPCP i/o ACB.

3.1.1 Identificació dels aïllats de *Pseudomonas* a nivell d'espècie

La classificació d'aïllats dins el gènere *Pseudomonas* i en espècies dins el gènere és i ha estat un dels grans reptes des de que aquest gènere va ser definit per Migula fa més de 100 anys (1884). Aquests problemes, però, no són patrimoni exclusiu de *Pseudomonas* sinó que són comuns amb altres grups bacterians. Des d'un punt de vista taxonòmic, la diversitat de característiques que s'han trobat tradicionalment en la definició del gènere, ha estat la base per a la incorporació d'un gran nombre d'espècies dins el gènere. El desenvolupament de claus determinatives basades en un conjunt de característiques sense ambigüitat ha estat motiu de discussió entre diferents grups de treball sobre taxonomia. Així, els sistemes de classificació que s'havien desenvolupat en la primera meitat del segle XX no han esdevingut fiables. No va ser fins al treball profund i extensiu iniciat per Stanier i col. (1966) i seguit per altres, que es van establir un seguit de divisions taxonòmiques dins el gènere que, amb petites variacions, han estat vàlides fins a l'actualitat. A més, en algunes de les espècies definides també es van proposar divisions internes, però aquestes no són del tot

satisfactòries perquè hi ha una elevada presència de soques que presenten formes intermèdies (Champion i col. 1980, Barret i col. 1986).

Taxonòmicament, s'ha reservat el nom de gènere *Pseudomonas*, anomenant-lo *Pseudomonas* (sensu stricto) al "grup d'homologia RNA I *P. fluorescens*", per la posició central d'aquesta espècie dins el grup. Les espècies dels altres grups d'homologia rRNA, s'han classificat sota el nom de gèneres com *Burkholderia* (rRNA II), *Comamonas*, *Acidovorax* i *Hydrogenophaga* (rRNA III) (Palleroni 1992).

El gènere *Pseudomonas* (sensu stricto) conté espècies que són fluorescents i altres que no ho són, atenent a les característiques de Gram negatiu, morfologia coc-bacilar, mobilitat i metabolisme oxidatiu. Les altres característiques que s'han considerat importants per a la classificació en espècies dins el gènere han estat la producció de pigments fluorescents, el creixement a 4 i 41 °C, la no acumulació de grànuls de poli- β -hidroxibutirat com a material de reserva, i, el resultat (negatiu o positiu) de les proves de desnitrificació, arginina dihidrolasa, producció de levans, oxidasa, gelatinasa i lipasa. Apart d'aquestes característiques es disposa de nombroses proves d'utilització de sucres i aminoàcids per acabar de separar espècies o realitzar divisions internes que s'han anomenat biovars com en el cas de *P. fluorescens* i *P. putida*. A la taula 3.1 es mostren les característiques diferencials per a la determinació de les espècies i biovars segons Palleroni (1984).

La disponibilitat de sistemes comercials d'identificació permet actualment la classificació d'aïllats d'una manera força acurada i ràpida. Els dos sistemes d'identificació comercial més emprats són el Biolog i les galeries API. Aquests sistemes no estan, però, dissenyats per a la identificació d'aïllats naturals del sòl i de les plantes, sinó que s'han comercialitzat per a bacteris que tenen importància clínica o implicacions en altres àmbits com pot ser l'anàlisi d'aigües (Klinger i col. 1992). Un sistema multiprova com l'API pot ser emprat per una identificació preliminar a nivell d'espècie ja que permet l'anàlisi de gran nombre d'aïllats en un període curt de temps i amb un cost econòmic bastant acceptable. En el cas de les espècies que són interessants en el present treball, l'API 20NE només separa les espècies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* i *P. putida*. Les espècies *P. aureofaciens* i *P. chlororaphis* es consideren sinònims de *P. fluorescens*.

Taula 3.1 Característiques utilitzades per diferenciar les espècies i biovars del gènere *Pseudomonas* (sensu stricto). Font: Palleroni 1984.

Table 3.1 Characteristics used for differentiating species and biotypes of *Pseudomonas* (sensu stricto). From Palleroni 1984.

Prova	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i> biovar					<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. aureofaciens</i>	<i>P. putida</i> biovar	
		I	II	III	IV	V			A	B
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilitat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acumulació de PHB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina dihidrolasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creixement a 41°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Creixement a 4°C	-	+	+	+	+	d	+	+	d	+
Producció de										
piocianines	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pioverdines	+	+	d	+	+	d	d	+	+	d
fenazines	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
clororanfina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Desnitrificació	+	-	+	+	+	-	+	-(d)*	-	-
Producció de levans	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Liqüefacció de gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Lecitinasa	-	+	+/-	+	+	d	+	d	-	-
Lipasa	+/-	d	-	d	d	d	+	d	d	d
Utilització de										
L-Arabinosa	-	+	+	d	+	d	-	+	d	+
Sorbitol	-	+	+	d	+	d	-	-	-	d
D-Alanina	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+

*en algunes taules s'indica com a - i en altres com a d.

* in some tables it is indicated as -, in others as d.

Contràriament, el sistema Biolog té un cost econòmic més elevat i cal una inversió en equipament per a la lectura de resultats que no és necessari en el cas del sistema API. Cal esmentar, però, que en lloc de les 20 proves de què consta en general l'API, el sistema Biolog té en compte 96 proves que inclouen fonts de carboni agrupades en 11 categories, polímers, hidrats de carboni, ésters, àcids carboxílics, amides, aminoàcids, amines, compost amb brom, compostos aromàtics i fosforilats, i alcohols. En el cas de les galeries API, el resultat està condicionat al creixement del bacteri en les multiproves mentre que en el Biolog la lectura dels resultats implica només oxidació (reducció de l'indicador), però no te perquè haver-hi creixement.

3.1.2 Metabòlits i compostos que poden estar implicats en la capacitat d'actuar com a BPCPs i ACBs

Com s'ha comentat en la introducció general (Capítol 1), el gènere *Pseudomonas* es caracteritza per la producció d'un ampli ventall de metabòlits secundaris com es mostra a la Figura 3.1. Alguns, possiblement els més importants, atès que s'ha demostrat la seva importància en el biocontrol, són els floroglucinols, les fenazines i els pirrols. D'altres com el HCN, sideròfors i

quitinases també se'ls ha relacionat amb el biocontrol mentre que la producció d'auxines com l'àcid 3-indolacètic ho ha estat en la promoció del creixement de les plantes.

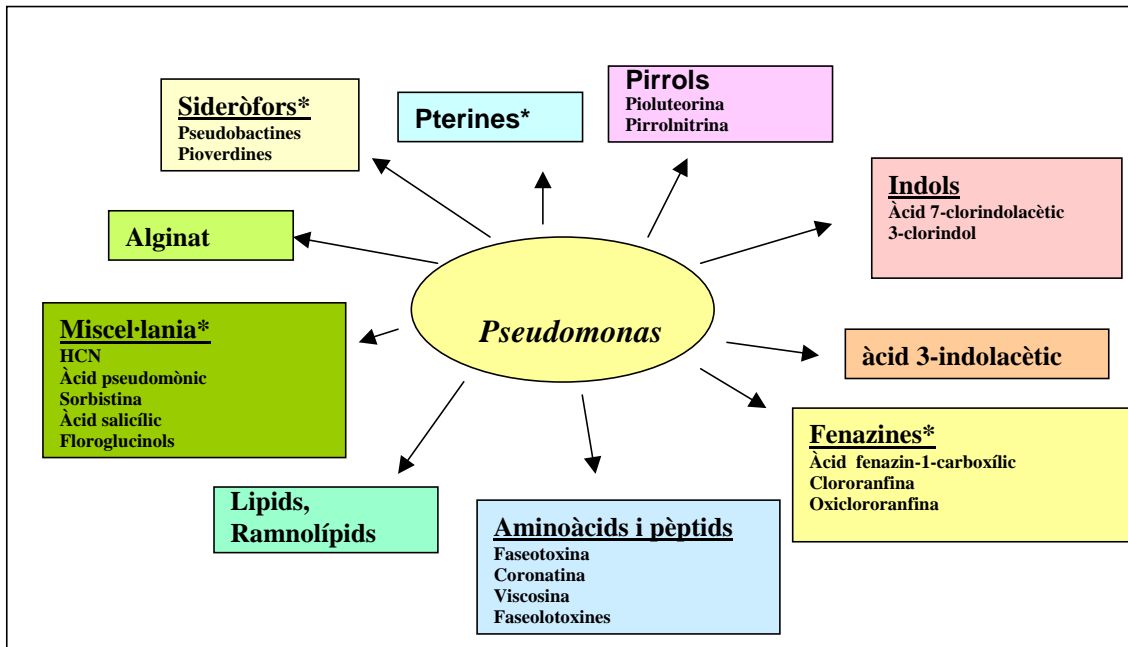


Figura 3.1 Metabòlits secundaris i altres compostos produïts per *Pseudomonas* (Part de les dades s'han extret de Leisinger i Margraff (1979)). Els compostos marcats amb un asterisc han estat implicats en el biocontrol d'una soca productora del metabòlit. Font: Dowling i O'Gara 1994.

Figure 3.1 The range of secondary metabolites and other compounds produced by fluorescent *Pseudomonas* (Data largely extracted from Leisinger i Margraff (1979)). The compounds indicated by an asterisk have been implicated in the biocontrol ability of the producer strain. From Dowling and O'Gara 1994.

Floroglucinol, àcid fenazin-1-carboxílic i pirrolnitrina

Aquests tres metabòlits són els que més directament s'han implicat en processos de biocontrol i s'han comentat ja en el capítol 2. El floroglucinol (Phl) és el metabòlit fenòlic que té més expectatives en el biocontrol (Mathre i col. 1999), per la seva activitat antibiòtica d'ampli espectre (Fenton i col. 1992, Maurhofer i col. 1992, Bangerà i Thomashow 1996, Cronin i col. 1997). Apart de l'ampli espectre també s'ha demostrat que pot tenir un efecte fitotòxic, i per tant, una elevada producció pot arribar a ser perjudicial (Haas i col. 1991, Maurhofer i col. 1992, Harrison i col. 1993, Alemany 2001). L'interès creixent en l'aïllament de soques productores de Phl per poder-les emprar com a ACBs, queda palès en la quantitat de treballs científics publicats en els darrers anys (Défago i Haas 1990, Fenton i col. 1992, Laville i col. 1992, Shanahan i col. 1992, Nowak-Thompson i col. 1994, Bonsall i col. 1997, Cronin i col. 1997, Duffy i Défago 1997, 1999, 2000, Raaijmakers i col. 1997, 1999a, 1999b, Raaijmakers i Weller 1998, 2001, Picard i col. 2000, Mavrodi 1998, 2001, McSpadden Gardener i col. 2000, 2001).

L'àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) és un compost heterocíclic que conté nitrogen i que és pigmentat. En un inici es creia que la producció de PCA era el mecanisme més important en el

biocontrol del “Take-all” del blat en sòls supressius, fins que l'aïllament de soques productores de PhI i els posteriors treballs realitzats amb aquestes van demostrar que era la producció de PhI i no la de PCA, la responsable del biocontrol (Thomashow i Weller 1988, 1996, Raaijmakers i Weller 1998, Raaijmakers i col. 1999a). Malgrat això, s'ha vist que la barreja de soques productores de PhI i PCA poden augmentar les possibilitats d'aplicació (Mazzola i col. 1995, Mathre i col. 1999).

La pirrolnitrina (Prn) és un metabòlit amb activitat antifúngica d'ampli espectre (Ei-Banna i Winkelmann 1998) que ha servit també pel desenvolupament de metabòlits sintètics amb nous mecanismes d'actuació com el fludioxonil o el fenpiclonil (Knight i col. 1997).

Àcid-3-indolacètic (IAA)

Un nombre elevat de bacteris associats a plantes tenen la capacitat de sintetitzar aquesta hormona reguladora del creixement vegetal. En bacteris aplicats a la rizosfera com *Azospirillum brasilense*, sembla que hi ha evidència que part de l'efecte que té en la promoció de creixement sigui degut a la producció d'IAA, però també s'han descrit efectes contraris com poden ser alteracions en el creixement de les arrels o reducció del pes de les plantes relacionats amb altes produccions d'IAA (Beyeler i col. 1999). Alguns autors creuen que la producció d'IAA pot jugar també un paper important en la fillosfera influint en la capacitat de colonització dels bacteris. Beattie i Lindow (1999), en estudis d'avaluació d'estratègies que empren els bacteris epífits en la colonització de les fulles (*P. fluorescens*, *Pantoea agglomerans*) i altres bacteris fitopatògens (*P. savastanoi*) que es multipliquen en els espais intercel·lulars, citen que la producció d'IAA provoca una pèrdua més gran de nutrients per part de l'hoste i, per tant, una major disponibilitat de nutrients que afavoreix un creixement superior de la població bacteriana productora d'IAA. Aquesta idea ve refermada per la demostració de que l'aplicació exògena d'auxines estimula l'alliberament de monosacàrids i oligosacàrids de la paret cel·lular vegetal (Brandl i Lindow 1998). Altres estudis demostren que la producció d'aquests reguladors pot estar influenciada pels compostos alliberats per les plantes (Benizri i col. 1998). En el cas dels fruiters, hi ha estudis que estableixen una relació lineal entre el “rosseting” de les peres (una mena de rugositat de l'epidermis que li dóna un aspecte surós) i la població de bacteris productors d'IAA (Lindow i col. 1998).

Treballs portats a terme amb *P. fluorescens* CHA0, productora d'IAA, van mostrar que la producció d'IAA té més importància en la promoció del creixement que no com a mecanisme de biocontrol, ja que aquest últim s'atribueix a la producció d'altres compostos com HCN i PhI (Beyeler i col. 1999). En aquesta soca en concret, s'ha demostrat la importància de l'enzim triptòfan desaminasa (TSO) en la biosíntesi d'IAA i al mateix temps s'ha vist que la regulació d'aquest enzim està relacionada amb la regulació de la síntesi de HCN i floroglucinol a nivell del sistema de regulació de dos components GacA/GacS (Oberhänsli i col. 1991, Duffy i Défago 2000).

Quitinases

La quitina és un homopolímer format per residus d'*N*-acetil-D-glucosamina (NacGlc) units mitjançant enllaços β -1,4 formant cadenes no ramificades i distribuïdes en configuracions anti-paral·leles (α) i paral·leles (β) amb diferents graus d'acetilació. Aquest polímer està àmpliament distribuït a la natura formant part d'estructures d'invertebrats, protozous, certs grups d'algues i de la paret cel·lular dels anomenats vertaders fongs. La degradació d'aquest polímer té interès no solament com a mecanisme de biocontrol sinó que és un procés microbià important en el cicle biogeoquímic del carboni i nitrogen i, en el cas de les plantes, es coneix també que la producció de quitinases induïdes per fongs patògens forma part del sistema de defensa de la planta.

L'activitat quitinolítica pot consistir en l'acció de diferents enzims que hidrolitzen els enllaços β -1,4 entre els residus de NacGlc: (a) Quitinases o endoquitinases (β -1,4-poli-*N*-acetil-glucosaminidasa) que hidrolitza a l'atzar alliberant oligòmers; (b) Exoquitinases (exo-*N,N'*-diacetilquitobiohidrolasa) que hidrolitzen els terminals dels polímers i els oligòmers curts alliberant quitobiosa; i (c) *N*-acetil-glucosaminidasa o NAGasa que hidrolitza oligòmers curts (normalment dímers de quitobiosa) alliberant residus de NacGlc.

L'activitat quitinasa està àmpliament distribuïda entre els bacteris del sòl i també s'ha descrit en el gènere *Pseudomonas* (Gaffney i col. 1993, Nielsen i col. 1998, Nielsen i Sorensen 1999). Els enzims quitinolítics sembla que poden ser constitutius o induïbles. S'ha pogut demostrar que *P. aeruginosa* presenta dos isoenzims diferents amb activitat endoquitinasa (Wang i Chang 1997). En *P. fluorescens* i *P. stutzeri* també s'ha demostrat l'activitat quitinolítica i en la primera espècie els enzims són endoquitinases i exoquitinases. La producció d'endoquitinases sembla que té lloc durant la fase exponencial del creixement i, posteriorment, són modificats per processos postransduccionals en varis isoenzims a mesura que els cultius arriben a la fase estacionària (Nielsen i Sorensen 1999). En les soques de *P. fluorescens* CHA0 i BL915 la producció de quitinases està controlada per sistemes reguladors de la fase estacionària (Gaffney i col. 1993, Sacherer i col. 1994)

La producció de quitinases per fongs com *Trichoderma* o bacteris (principalment de l'espècie *Pantoea agglomerans*) ha mostrat ser un mecanisme important d'antagonisme envers fongs amb la paret cel·lular formada per quitina com *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* i *Penicillium* (Chet i col. 1990). Però en *Pseudomonas* no s'han realitzat treballs específics per determinar la importància de l'activitat quitinolítica, a excepció d'un treball amb *P. stutzeri* que suggereix la implicació d'aquesta activitat quitinolítica en la inhibició del creixement de *Fusarium solani* (Lim i col. 1991). Un altre punt d'interès molt actual relacionat amb les quitinases és l'estudi de proteïnes, derivades de plantes, que tenen dominis d'unió a quitina . Aquests dominis són molt homòlegs als de les

quitinases però sense presentar el domini catalític d'hidròlisi d'aquestes ja que han mostrat que poden inhibir també el creixement del fong (Nielsen i col. 1997). Proteïnes semblants han estat descrites en algunes soques d'origen clínic de *P. aeruginosa* però no en *P. fluorescens* ni *P. putida* (Folders i col. 2000).

Sideròfors

L'observació de que pioverdines purificades eren efectives contra diferents patògens *in vitro* i en sòls, i el fet de que mutants no fluorescents no eren capaços de provocar promoció del creixement com la soca salvatge, van fer considerar que la producció de sideròfors és molt important com a mecanisme d'actuació dels ACBs i BPCPs (Becker i Cook 1988, Loper i Buyer 1991).

S'ha de tenir en compte, però, que el ferro intervé en la biosíntesi d'altres metabòlits amb capacitat antagonista com en el cas del HCN (que es comenta en el següent apartat). Per tant, els mutants deficients en la producció de pioverdines, aquests poden reflectir canvis metabòlics globals associats amb la manca de ferro. Per tant, no es pot afirmar que la competició pel ferro sigui l'únic mecanisme per explicar la correlació que es pot observar entre l'activitat de biocontrol i la síntesi de pioverdines (Tomashow i Weller 1996). A mesura que les tècniques emprades en l'estudi de l'activitat microbiana en el sòl han esdevingut més sensibles i específiques, s'ha consolidat la idea que els sideròfors contribueixen com a mecanisme de biocontrol en certes malalties de plantes solament quan els factors fisico-químics que determinen la disponibilitat de ferro en el sòl són favorables a la producció i activitat dels sideròfors (Fujimoto i col. 1995).

HCN

La biosíntesi de HCN s'ha demostrat en poques espècies bacterianes, com *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* i *Chromobacterium violacearum*. La producció d'aquest compost volàtil és màxima en el període de transició entre la fase exponencial de creixement i l'estacionària (Alemany 2001). Els factors ambientals que modulen la seva producció són les concentracions de ferro, fosfat i oxigen. A més, la producció de HCN està regulada, juntament amb altres metabòlits implicats en el biocontrol com el PhI, pel sistema regulador de dos components GacA/GacS (Laville i col. 1998, Duffy i Défago 2000) i, a nivell més concret, pel regulador anaeròbic ANR (Blumer i Haas 2000a).

El cianhídric és el metabòlit volàtil que més interès ha despertat com a mecanisme de biocontrol. La cianogènesi bacteriana pot ser beneficiosa (si provoca la supressió del patogen) o contraproductiu (causant la inhibició del creixement de la planta i reducció de la producció en pes) amb dependència del sistema que s'estudiï. La major part d'estudis relacionats amb la producció de HCN com a mecanisme de biocontrol s'han portat a terme en *P. fluorescens* CHA0, posant en

evidència que la producció de HCN contribueix a la supressió de *Thielaviopsis basicola* (Voisard i col. 1989).

Una de les primeres hipòtesis per explicar el mode d'actuació del HCN en el biocontrol va raure en la assumpció de que probablement estimulava la resposta de defensa de les plantes (Voisard i col. 1989). Aquesta hipòtesi no té molta acceptació donat que mutants en el sistema de regulació de dos components GacA/GacS que afecta la producció d'altres metabòlits secundaris i inclusivament del HCN eren tant efectius com la soca salvatge en la inducció de resistència de l'hoste (Laville i col. 1998, Blumer i Haas 2000a). Com a resultat d'aquests treballs es va suggerir que el HCN controlava directament al patogen. Cal tenir en compte que en aquest cas, la toxicitat del HCN dependrà de la susceptibilitat del patogen i també de l'espècie de planta hoste per a assolir l'efecte desitjat. A més, la producció vindrà modulada per factors abiòtics com la disponibilitat de precursors (per exemple glicina) i de ferro (Keel i col. 1989). S'ha citat, per exemple, que l'existència d'elevades poblacions bacterianes productores de HCN poden reduir la producció dels conreus i que aquesta inhibició del creixement és deguda a la fitotoxicitat del HCN. En aquests casos l'aplicació de microorganismes que puguin provocar la disminució de ferro disponible per als productors de HCN representen un augment de la promoció del creixement en evitar la fitotoxicitat del HCN en l'hoste (Fujimoto i col. 1995).

3.1.3 Objectius

L'objectiu general plantejat en aquest capítol ha estat la caracterització fenotípica dels aïllats bacterians. Els objectius concrets han estat :

- 1-Classificar a nivell d'espècie un conjunt d'aïllats escollits, emprant proves microbiològiques clàssiques així com galeries API 20NE.
- 2- Determinar la producció de compostos associats amb la capacitat d'actuar com a BPCP i ACB: sideròfors, àcid-3-indolacètic, quitinases, àcid cianhídric, floroglucinol, àcid fenazin-1-carboxílic i pirrolnitrina.
- 3- Determinar l'espectre d'antagonisme *in vitro* i l'eficàcia en la inhibició d'infeccions causades per diversos bacteris i fongs fitopatògens, i la capacitat de promoció del creixement en plantes.

3.2 Material i mètodes

3.2.1 Aïllats i soques emprades en el treball

En aquest apartat, s'han utilitzat 72 soques, 34 corresponents a aïllats de camp i que pertanyen al socari de l'INTEA (Annex 1), 6 a col·leccions de cultius tipus, 14 a soques cedides per altres investigadors i 18 aïllats obtinguts específicament en el present treball. Aquests 18 aïllats són portadors dels gens biosintètics per a la producció de PhI i PCA. L'objectiu de constituir aquesta col·lecció va ser poder disposar de soques pròpies productores dels diferents antibiòtics, a més de les cedides per altres investigadors. A la taula 3.2 es mostra la procedència i característiques dels aïllats emprats que formen part del socari de l'INTEA i que van ser identificades preliminarment com a *P. fluorescens*. La primera columna de la taula 3.2 correspon a les soques de *P. fluorescens* antagonistes del fong fitopatogen *Stemphylium vesicarium*, agent causal de l'estemfiliosi de la perera, les quals han estat aïllades i caracteritzades fenotípicament i respecte al seu espectre d'antagonisme *in vitro* enfront diversos fongs i bacteris fitopatògens (Vázquez 1994, Bonaterra 1995, 1997). La segona columna fa referència a soques de la mateixa procedència però que no van mostrar antagonisme en les proves preliminars de prospecció, sobretot pel que fa referència als fongs, tot i que poden mostrar en algun cas antagonisme contra altres fongs i bacteris fitopatògens (Bonaterra 1997). Per a l'elecció d'aquestes soques no antagonistes es va tenir en compte que tinguessin correspondència amb les soques antagonistes quant a l'hoste, òrgan d'aïllament i característiques bioquímiques generals, amb la intenció de disposar de soques que es poguessin prendre com a referència de control negatiu.

També s'han emprat les soques descrites en l'apartat de material i mètodes del Capítol 2 (taules 2.2 i 2.3) que van ser cedides per altres investigadors i que han estat estudiades en processos de biocontrol de varis microorganismes fitopatògens o en estudis d'ecologia de *P. fluorescens*, així com soques de referència dels diferents biovars de *P. fluorescens* procedents de col·leccions de cultius tipus. La resta d'aïllats van ser obtinguts en aquest treball tal i com es descriu al Capítol 2 i que són portadors dels gens implicats en la biosíntesi de metabòlits com PhI i PCA (807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 1019, 1024, 1025, 894, 895, i 944)

Taula 3.2 Soques de presumptives *P. fluorescens* aïllades per Vázquez (1994) i Bonaterra (1995, 1997) emprades en aquest treball.

Table 3.2 Putatives *P. fluorescens* strains, isolated by Vázquez (1994) and Bonaterra (1995, 1997) used in this study.

Soques antagonistes	Soques no antagonistes	Localitat	Mostra	Espècie	Òrgan*	Data d'aïllament
209, 210	202	Girona	7	cua d'escorpi	A	5/93
227	230	Girona	9	perera	A	5/93
263	264	Puig Neulós	14	faig	A	6/93
288	289	Aiguamolls Empordà	22	blat de moro	A	6/93
301	298	Vallter	26	gramínia	A	6/93
317	318	Girona	30	tabac	A	7/93
356	347	Girona	5	perera	B	/88
372	600, 360	Mas Badia	4	perera	F	/88
373, 375	378	Girona	5	perera	B	/88
381,383	379, 385	Banyoles	44	verònica	Fl	1/94
384	404	Banyoles	43	gramínia	F	1/94
531	424, 532	L'Armentera	135	presseguer	Fl	3/94
539	537	Calonge	131	perera	B	3/94
550	540	Calonge	166	cirerer	B	3/94

*Òrgan d'aïllament; A, arrel; B, borro; F, fulla; Fl, flor.

*Isolated from : A, root; B, buds; F, leaf; Fl, flower

3.2.2. Caracterització i identificació

3.2.2.1 Identificació a nivell d'espècie

La identificació a nivell d'espècie es va realitzar mitjançant la utilització de tècniques microbiològiques convencionals i pel mètode de les galeries API.

Galleries API 20NE

Les galeries API 20NE (Biomerieux, França), es van emprar seguint les especificacions del proveïdor. La identificació d'espècie mitjançant el codi obtingut es va realitzar amb la base de dades corresponent. Aquesta galeria combina 8 proves convencionals i 12 proves d'assimilació de sucres i àcids orgànics per a la identificació de bacteris Gram negatius. Les proves utilitzades en la galeria són desnitrificació (reducció de nitrats a nitrits o a nitrogen), formació d'indol, fermentació de glucosa, arginina dihidrolasa, ureasa, hidròlisi de l'esculina (β -glucosidasa), hidròlisi de la gelatina, β -galactosidasa, i assimilació de glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, maltosa, gluconat, caprat, adipat, malat, citrat i fenil-acetat.

Proves bioquímiques específiques per a *Pseudomonas*

Per a la caracterització i posterior identificació a nivell d'espècie, es van realitzar un conjunt de proves bioquímiques segons Digat i Gardan (1987), i Palleroni (1984). A la figura 3.2 es representa l'esquema dicotòmic per a la classificació segons Digat i Gardan (1987) emprat per Landa (1999). A la taula 3.1 en el Material i mètodes d'aquest capítol es mostren les característiques avaluades segons Palleroni (1984), a excepció de la producció de pirocianines, pioerdines, fenazines i clororanfina. Per diferenciar entre la classificació de Digat i Gardan (1987) i Palleroni, (1984), es fa referència a les proves bioquímiques 1 i 2.

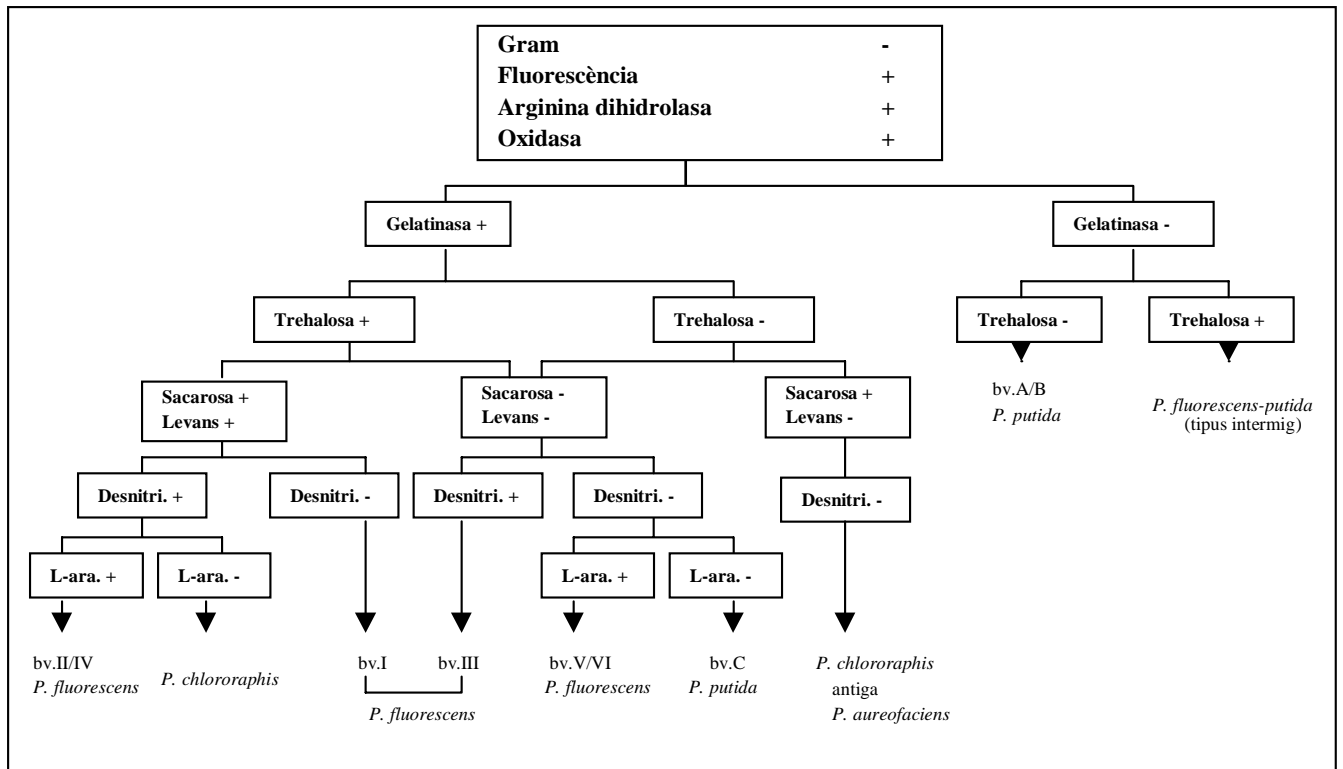


Figura 3.2 Claus dicotòmiques per a la identificació fins a espècie del gènere *Pseudomonas* (sensu stricto). Font: segons Digat i Gardan (1987).

Figure 3.2 Chart for the identification of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto). From Digat and Gardan (1987).

En els dos sistemes d'identificació que es van utilitzar en el nostre treball, es va determinar en primer lloc la tinció de Gram amb el mètode alternatiu de la potassa de Ryu (Ryu 1940) descrit a l'annex 2, la producció de pigments fluorescents en el medi diferencial KB (King i col. 1954), la prova de la mobilitat amb el mètode de la gota pendent, la morfologia i les proves bioquímiques de l'oxidasa, arginina dihidrolasa, gelatinasa, producció de levans, desnitricació i la utilització de L-arabinosa. Per a les proves bioquímiques 1 es va determinar, a més, la utilització de sacarosa i trehalosa. Quant a les proves bioquímiques 2, es van realitzar les proves d'oxidació/fermentació, acumulació de poli-β-hidroxibutirat, creixement a 4 i 41°C, activitat lecitinasa i lipasa, i utilització de sorbitol i D-alanina. Els medis de cultiu i els procediments emprats es descriuen a la taula 3.3.

Cada una de les proves es va realitzar per triplicat amb l'excepció de la tinció per observar l'acumulació de PHB, la prova de la mobilitat i la morfologia. Un cop obtinguts els resultats de les diferents proves es va procedir a la identificació dels aïllats.

Taula 3.3 Proves bioquímiques emprades per a la identificació de soques que pertanyen al grup de *Pseudomonas* (sensu stricto).

Table 3.3 Biochemical tests used for strain identification of *Pseudomonas* (sensu stricto).

Prova	Medi (g/L ⁻¹)	Reactiu	Detecció	Referència.
Oxidasa	-	Tetrametil-p-fenilendiamina	Viratge a color lila	Kovaks 1956
O/F (F en condicions d'anaerobiosi)	Peptona 2, NaCl 5, K ₂ HPO ₄ 0.3, glucosa 10, blau de bromotimol 0.06, agar 5.	-	Viratge a color groc	Hugh i Leifson 1953
Arginina dihidrolasa (ADH) (en condicions d'anaerobiosi)	Peptona 1, NaCl 5, K ₂ HPO ₄ 3, clor d'arginina 10, roig fenol 0.01, agar 6.	-	Alcalinització del medi, viratge a color rosa.	Thornley 1960
Creixement a 4 i 41°C (2) (s'inoculaven tubs amb el mateix medi durant 24 h a temperatura òptima i s'afegia una nansa del cultiu líquid al medi que prèviament estava incubat a la temperatura que es vol provar)	NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.5, K ₂ HPO ₄ 0.5, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2, NaCl 4.5, extracte de llevat 5.	-	Creixement	Hildebrand i col. 1988
Desnitricació (amb campana de Durham)	KNO ₃ 1, peptona 5, extracte de llevat 3	-	Formació de gas	Hildebrand i col. 1988
Levans	Agar nutritiu amb glucosa substituïda per sacarosa al 5%	-	Colònies convexes brillants	Hildebrand i col. 1988
Hidròlisi de la gelatina	Extracte de llevat 3, peptona 5, gelatina 120	-	Liqüefacció	Lelliot i Stead 1987
Lecitinasa (se sembraven en superfície i per picadura en plaques del medi, amb l'ajut d'un escuradents estèril impregnat amb la colònia)	Extracte de llevat 3, peptona 5, NaCl 5, glucosa 2.5 dissolts en 900 mL d'aigua destil·lada i s'autoclava. Quan el medi està a 50°C s'afegeixen 100 mL d'una solució de rovells d'ou al 40% en aigua destil·lada	-	Producció d'un precipitat blanc al voltant de la colònia	Lelliot i Stead 1987
Acumulació de grànuls de poli-β-hidroxibutirat (PHB)	YPGA. Extracte de llevat 5, peptona 5, D(+)-glucosa 10, agar 15	Colorant negre de Sudà	Tinció amb negre de Sudan. Observació al microscopi. (annex 2)	DOCE 235 de 21.8.98

Taula 3.3 Continuació
Table 3.3 Continuation

Prova	Medi (g/L ⁻¹)	Reactiu	Detecció	Referència
Lipasa (procediment igual que en el cas de la lecitinasasa)	Peptona 10, NaCl 5, CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.1, agar 20 i s'autoclava. Quan el medi està a 50 °C s'afegeixen 10 mL de Tween [®] 80 autoclavat.	-	Producció d'un halo tèrbol al voltant de la colònia	Lelliot i Stead 1987
Utilització de Trehalosa i sacarosa	NH ₂ H ₂ PO ₄ 1, KCl 0.2, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2, blau de bromotimol, 0.03, agar 3. S'afegeix el sucre (sacarosa o trehalosa) 5	-	Acidificació del medi, viratge a color groc	Landa 1999
Utilització de : L-arabinosa, Sorbitol, D-alanina	Medi mínim: NH ₄ Cl 1, KH ₂ PO ₄ 2, KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 2, MgSO ₄ 0.1, Fe ₂ (SO ₄) ₃ 0.01 , i 10 µL d'una solució 0.1M de CuCl ₂ , ZnSO ₄ , MnSO ₄ , CoCl ₂ , NiCl ₂ ·6H ₂ O i Na MoO ₄ de manera que quedi el medi a una concentració 1µM. S'addiciona el sucre o aminoàcid 4	-	Creixement bacterià i terbolesa	Nielsen i col. 1998

(1) com a control positiu es va emprar la soca *B. solanacearum* 8174, mutant avirulent de la col·lecció de l'IVIA; (2) *P. aeruginosa* CECT110T es va utilitzar com a control positiu de creixement a 41°C i negatiu a 4 °C.

(1) strain *B. solanacearum* 8174 avirulent mutant was used as positive control; (2) *P. aeruginosa* CECT110T was used as positive control of grow at 41°C and negative at 4 °C

3.2.2.2 Proves complementàries. Patogenicitat en tabac i activitat nucleadora de gel

En l'espècie *Pseudomonas fluorescens* s'han descrit soques que provoquen la resposta hipersensible en tabac (HR⁺) i/o que poden actuar com a nuclis formadors de gel (INA⁺). Per tant, abans de poder emprar una soca de *Pseudomonas* com a agent de biocontrol, cal determinar aquestes dues característiques, assumint que la presència de tan sols una d'elles obligarà al seu rebuig com a BCA.

Resposta hipersensible en tabac (HR)

La manca de patogenicitat es posa de manifest amb la realització d'aquesta prova i es basa en determinar la incapacitat per desencadenar la resposta hipersensible en planta de tabac. Si un bacteri és fitopatogen, la seva inoculació a una concentració elevada en fulles de planta de tabac (essent el tabac un hoste no compatible), provocarà l'expressió dels gens *hrp* i la planta manifestarà símptomes coneguts com a reacció hipersensible. Els símptomes que es poden observar a les 24 h són necrosis bloquejants limitades entre dos nervis, i teixits dessecats de color beig grisós i lluïssor metàl·lica (Klement 1963). En el cas de que el bacteri sigui fitopatogen i el tabac sigui un hoste compatible es desenvoluparà la malaltia i, si el bacteri no és fitopatogen, no es produiran els símptomes descrits de la reacció hipersensible.

Es van preparar suspensions de les soques fins assolir una concentració de 10⁸ ufc/mL ajustats amb la mesura de l'absorbància de 0.3 a 0.4 a 620 nm a partir de cultius de 24 h en medi KB. Després de realitzar les ferides en la fulla amb una agulla, s'inoculaven les suspensions, amb l'ajut

d'una xeringa hipodèrmica per infiltrar el mesòfil, en el revers de les fulles de plantes joves de tabac de la varietat Xanthi. Es va inocular la soca patògena *P. syringae* EPS94 (Moragrega 1997) com a control positiu i aigua destil·lada com a control negatiu.

Un cop inoculades les plantes, es van incubar a 20 °C i 70% d'humitat i un fotoperíode de 16 h de llum, realitzant la lectura 24 h després de la inoculació.

Activitat nucleadora de gel (INA)

Alguns bacteris poden actuar com a nuclis formadors de gel (INA⁺), és a dir, formar gel a temperatures superiors a les que es formaria el gel sense la presència d'aquests nuclis, provocant danys per gelada a les plantes hoste (Warren i col. 1986, Montesinos i Vilardell 1988).

Es van preparar suspensions de les soques i aïllats en aigua destil·lada estèril fins assolir una concentració de 10⁸ ufc/mL ajustats amb la mesura de l'absorbància de 0.3 a 0.4 a 620 nm a partir de cultius de 24 h en agar KB. Les suspensions es preincubaven a 4 °C durant 2 h per a induir l'activitat nucleadora de gel i, seguidament, els tubs es col·locaven en un bany criogènic d'alcohol, realitzant un gradient de 0 °C a -10 °C en 20 min. La prova es va realitzar per triplicat en cada soca, emprant com a control negatiu la soca *P. fluorescens* EPS200 (Bonaterra 1997) i com a control positiu la soca patògena *P. syringae* EPS94 (Moragrega 1997). La congelació de la suspensió de bacteris abans de 20 min es considerava un resultat positiu de l'activitat nucleadora del gel i, per tant, INA⁺.

3.2.3 Determinació de la producció de metabòlits

La producció de sideròfors, quitinases, àcid 3-indolacètic (IAA) i àcid cianhídric (HCN) es va determinar per a totes les soques, mentre que la producció de floroglucinol (PhI), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) i pirrolnitrina (Prn) només es va fer en les soques que havien donat positiu en la PCR i, per tant, portadores dels gens implicats en la biosíntesi del metabòlit en qüestió (Capítol 2).

3.2.3.1 Producció de sideròfors, quitinases, àcid 3-indolacètic i àcid cianhídric

A la taula 3.4 s'indiquen els medis emprats en la determinació d'aquests metabòlits, així com el procediment i lectura de resultats.

Taula 3.4 Medis, procediments i determinació de la producció de diferents metabòlits i enzims.

Table 3.4 Media, procedures and determination of production of different metabolites and enzymes.

Producció de (Referència)	Medi	Procediment	Lectura

Quitinases (Frändberg i Shnürer 1998)	(en g/L) en plaques quitina col·loïdal ⁽¹⁾ 1.5, K ₂ HPO ₄ 2.7, KH ₂ PO ₄ 0.3, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.7, NaCl 0.5, KCl 0.5, extracte de llevat 0.13, agar 20.	Se sembraven en superfície i per picadura en plaques del medi, amb l'ajut d'un escuradents estèril impregnat amb la colònia. En el cas de les quitinases es va emprar com a control positiu la soca <i>P. fluorescens</i> BL915.	Després de la incubació durant 5-7 dies a 30 °C s'observava en les soques positives l'aparició d'un halo transparent al voltant de la colònia (la placa és opaca).
Sideròfors (Schwyn i Neilands 1987)	(g/L) en plaques 60.5 mg CAS (Chrome azulol S) es dissolen en 50 mL d'H ₂ O i es barregen amb 10 mL de Fe ³⁺ (1 mM FeCl ₃ ·6H ₂ O, 10 mM HCl); en condicions d'agitació s'afegeix a aquesta solució 72.9 mg HDTMA (Bromur d'hexadeciltimetilamoni) dissolt en 40 mL d'H ₂ O i s'autoclava. S'autoclava també una solució de 750 mL d'H ₂ O, 100 mL de sals 10x MM9 ⁽²⁾ , 15 g d'agar, 32 g Pipes i 12 g d'una solució de NaOH al 50% (pes/pes) per assolir un pH de 6.8. S'ajunten les dues solucions anteriors i, un cop refredat a 50 °C, s'afegeixen 30 mL d'una solució d'àcids casamínics com a font de carboni (10%) esterilitzats per filtració.	Se sembraven en superfície i per picadura en plaques del medi, amb l'ajut d'un escuradents estèril impregnat amb la colònia. En el cas de les quitinases es va emprar com a control positiu la soca <i>P. fluorescens</i> BL915.	Aparició d'un halo de color taronja al voltant de la colònia (el color de la placa del medi és blau)
IAA (Bric i col. 1991)	(g/ 900 mL) en plaques triptona 10, NaCl 10, extracte de llevat 5, agar 15. Un cop autoclavat el medi i a una temperatura de 50 °C s'afegeixen 100 mL d'una solució 5 mM de L-Triptòfen esterilitzats per filtració.	Al damunt del medi es va dipositar una membrana de nitrocel·lulosa. Se sembraven en superfície i per picadura en les plaques al damunt de la membrana, amb l'ajut d'un escuradents estèril impregnat amb la colònia. Com a control positiu es va emprar la soca <i>P. fluorescens</i> CHAO.	Després d'incubar a 28°C durant 3 dies es va col·locar al damunt un filtre de paper Whatman 2 saturat amb el reactiu de Salkowski (2% 0.5 M FeCl ₃ i 35% HClO ₄). Si entre 30 minuts i 3 hores s'observava una coloració rosa o vermella, la prova es considerava positiva, mentre que els negatius presenten una coloració groguenca - marronosa.
HCN (Sneath 1966)	(g/L) en tub roscat (4 mL) triptona 10, NaCl 10, extracte de llevat 5, agar 15.	Se sembla en picada en el tub i s'introdueix una tira de paper de filtre estèril impregnada amb picrat alcalí (solució d'àcid pícric al 0.5% i NaCO ₃ al 2%) de manera que no estigui en contacte amb el medi de cultiu. S incuben 3 dies 22-25 °C.	La prova és positiva si les tires impregnades en picrat alcalí de color groc, viren a un color taronja intens.

(1) i (2) la composició i preparació es troben en l'annex 2.

(1) and (2) the composition and preparation are explaining in annex 2.

Amb les quitinases també es va realitzar una aproximació molecular de detecció dels gens per PCR. Alguns gens estructurals que codifiquen per a quitinases han estat clonats i seqüenciats, tant de bacteris com d'altres organismes. Malauradament no hi ha seqüències dipositades en el GenBank de quitinases procedents de *Pseudomonas*, sinó que majoritàriament pertanyen a *Enterobacter*, *Serratia*, *Vibrio*, *Aeromonas* o *Bacillus*. Malgrat tot, es va trobar una referència

bibliogràfica en la que s'empraven encebadors dissenyats a partir de la seqüència d'una quitinasa de *Serratia marcescens* per detectar i clonar una quitinasa d'*Enterobacter agglomerans*. Per tant, es va procedir a realitzar la prova emprant les soques *P. fluorescens* BL915, CHA0 i EPS263 que se sabia que produïen quitinases. Es van emprar els encebadors descrits per Chernin i col. (1997) que corresponen a les seqüències 5'-TATCCTCTCGGAATAA-3' i 5'-GAATTCCTCAAACAATCT-3' utilitzant la Taq polimerasa de Roche diagnostics (anex 2). Per a la realització de la PCR i la visualització dels resultats es va procedir com en l'apartat 2.2.3.2 i es va provar també amb DNA extret dels cultius mitjançant el mètode d'extracció de DNA descrit en l'apartat 2.2.4.2. El volum total en cada tub de reacció va ser de 25 µL, amb els següents components :

Component	µL/ tub de reacció
H ₂ O Mili-Q estèril	11
Tampó (10x)	2.5
Cl ₂ Mg (25mM)	1.5
DNTPs (2mM)	2.5
Encebador 1 (10pm/µL)	1
Encebador 2 (10pm/µL)	1
Taq (3.5U/µL)	0.5 (5U/µL)
mostra	5

La PCR es va realitzar amb un termociclador Gene Amp ® PCR System 9700 (Perkin-Elmer). El programa consistia en un primer període d'escalfament a 94°C durant 5 min, 25 cicles de 94 °C durant 1 min, 54 °C per 1 min i 72 °C per 1.5 min amb un període d'extensió final de 72 °C durant 4 min. Els gels d'agarosa utilitzats en l'electroforesi eren del 0.8 % per poder resoldre el fragment de 2165 pb que s'obtenia en *Enterobacter*.

3.2.3.2 Producció de floroglucinol (Phl), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) i pirrolnitrina (Prn)

Producció de Phl i PCA

La detecció de la producció de Phl i PCA es va realitzar amb la tècnica de cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) segons els protocols descrits per Keel i col. (1992), Bonsall i col. (1997) i Van Pée i col. (1983) adaptats a un sistema de microextracció segons Palmer i Bender (1993) posats a punt per Montojo (1999) i Alemany (2001).

Es van inocular 10 mL de brou LB suplementat amb glucosa al 1 % amb la soca d'interès. Després d'un període d'incubació de 48 h a 25 °C en agitació (100 rpm) es procedia a prendre 1 mL del cultiu i se centrifugava a 5.000 g durant 20 min a temperatura ambient. S'afegien al sobrenedant 50 mg de NaCl, 20 mL HCL 1M i 500 µL d'acetat d'etil agitant-lo amb el vòrtex durant 30 s. Després de centrifugar a 10.000 g durant 1 min, s'evaporaven al buit 400 µL del sobrenedant a temperatura ambient. El residu es va resuspendre en 800 µL de la fase mòbil (40% d'acetonitril i 60 % d'una solució 0.24 % d'àcid tricloracètic, pH 2.4) i s'injectaven 20 µL a l'HPLC. L'equip cromatogràfic estava compost per un controlador Waters 600E, un diode array 990, una columna Tracer Hypersil ODS 5 µm de dimensions 15 x 0.46 cm controlat amb el suport informàtic

Millenium 32. Les condicions de treball del cromatògraf van ser la utilització d'una fase mòbil (40% d'acetonitril i 60 % d'una solució 0.24 % d'àcid tricloroacètic, pH 2.4) i un cabal de 1 mL/min.

En aquestes condicions de treball, es va detectar el PhI i la PCA a un temps de retenció de 9 i 7.6 min, respectivament. Per confirmar que el pic resolt de les mostres corresponia a PhI, s'afegia a la mostra una petita quantitat de PhI obtingut per síntesi química o PCA d'origen bacterià (Alemany 2001). Si l'àrea i l'alçada del pic augmentava, indicava que el que s'havia detectat era realment el metabòlit (en cas contrari, apareixia un nou pic indicant que el compost obtingut podia pertànyer a un compost diferent al cercat).

Pirrolnitrina

La detecció de la producció de pirrolnitrina es va realitzar per cromatografia en capa prima (TLC) segons el protocol descrit i posat a punt per Alemany (2001). Al ser la pirrolnitrina fotosensible, tots els flascons emprats, tant de cultiu com pels posteriors procediments, es van embolcallar amb paper de plata per evitar la degradació del metabòlit. Com a control positiu es realitzava l'extracció de pirrolnitrina de *P. fluorescens* BL915.

Amb la soca d'interès es van inocular 200 mL de brou nutritiu. Després d'una incubació perllongada durant 85 h a 25 °C en agitació (125 rpm) es prenen 100 mL del cultiu, s'afegien 25 mL d'acetat d'etil i es mantenia la solució durant 2 min en un homogeneïtzador ultrasònic. A continuació se centrifugava a 13.000 g guardant el sobrenedant. Al sediment s'afegien 25 mL més d'acetat d'etil i es realitzava una segona extracció. Finalment, es van ajuntar els sobrenedants obtinguts en les dues extraccions.

De la fracció orgànica, es van prendre 15 mL i es van concentrar evaporant al buit a temperatura ambient durant 24 h. El residu es resuspensia en 100 µL d'acetat d'etil obtenint així l'extracte orgànic.

L'extracte orgànic es dipositava damunt d'una capa prima i es desenvolupava amb una barreja d'acetat d'etil-hexà (3:1) o cloroform-àcid acètic (95:5). Un cop seca la capa prima es va polvoritzar amb una solució de vanillina (1 g vanillina, 25 mL d'H₂O, 25 mL de metanol i 35 mL H₃PO₄) i es mantenia a l'estufa a 110 °C fins al desenvolupament del color lila característic de la pirrolnitrina present en el control positiu del cultiu procedent de *P. fluorescens* BI915.

3.2.4 Espectre d'antagonisme *in vitro*, bioassaigs d'inhibició d'infeccions i activitat promotora del creixement vegetal

Una de les metodologies més emprades en la determinació de l'activitat antagonista *in vitro* es basa en la realització de sèmbras conjuntes del bacteri que es vol provar amb el microorganisme

patogen que ha de ser avaluat, utilitzant plaques de Petri contenint diferents medis de cultiu. En la pràctica però, no existeix una correlació entre els resultats obtinguts entre l'antagonisme *in vitro* i la inhibició de la infecció causada per l'agent fitopatogen. S'assumeix en general que l'antagonisme que es posa de manifest amb els assaigs *in vitro* sol correlacionar-se amb la producció de productes antimicrobians. Per aquest motiu, cal a més, la realització de bioassaigs on intervingui el material vegetal adient a cada patogen. Els bioassaigs amb material vegetal valoren a més de l'antagonisme que pot venir relacionat amb la producció de substàncies antimicrobianes *in vivo*, la capacitat de colonitzar, sobreviure i multiplicar-se en el patosistema on ha d'actuar l'ACB, posant de manifest altres mecanismes d'acció com poden ser la competició per nutrients i per l'espai.

3.2.4.1 Espectre d'antagonisme *in vitro*

El potencial antagonista dels bacteris estudiats es va determinar mitjançant la capacitat de producció d'halos d'inhibició quan se sembraven conjuntament amb els bacteris i fongs fitopatògens indicadors en diferents medis de cultiu (Annex 2). Els bacteris i fongs fitopatògens emprats es mostren a la taula 3.5. Aquests es van sembrar en sobrecaja d'agar (emprant suspensions de cèl·lules en el cas de bacteris o conidis en el cas dels fongs). Les soques bacterianes que es volien estudiar es van inocular per picada a la superfície.

Per a la preparació de les suspensions dels fongs fitopatògens es va partir de plaques d'Agar Patata Dextrosa (PDA) sembrades amb *P. expansum* incubades durant 4 dies a 20 °C, i en el cas d'*S. vesicarium*, de plaques d'Agar tomata (TA) incubades durant 7 dies a 20 °C i sota un fotoperíode de 16 h de llum i 8 de foscor. Després de recollir els conidis en condicions estèrils arrosegant per la superfície del cultiu un cotó embolcallat en un palet de fusta (estèril), aquests es resuspenien en aigua destil·lada estèril amb Tween 20® (20µL/L). La concentració de conidis es va ajustar a 10⁵ conidis/mL quantificant-los mitjançant un recompte al microscopi amb una cambra hemocitomètrica tipus Thoma.

En el cas dels bacteris fitopatògens es partia de sèmres de 34 h del bacteri en agar LB incubades a 22 °C. Es resuspenien en aigua destil·lada estèril ajustant la concentració a 10⁸ ufc/mL mesurant l'absorbància a 620 nm.

Taula 3.5 Fongs i bacteris fitopatògens emprats en la determinació de l'antagonisme *in vitro*.
Table 3.5 Fungal and bacterial strains used in *in vitro* antagonism determination.

Patogen	Procedència
<i>Erwinia amylovora</i> CU273	CU (Universitat de Cornell, E.E.U.U.)
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 1317.3	IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias; València)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94	INTEA (Institut de Tecnologia Agroalimentària; Girona)
<i>Stemphylium vesicarium</i> EPS26	INTEA
<i>Penicillium expansum</i> EPSF	INTEA

Per a la determinació de la capacitat antagonista es van emprar els medis de cultiu, que s'indiquen a la taula 3.6. La sobre capa es realitzava afegint 0.2 mL de la suspensió de bacteris o conidis dels fongs a 4 mL d'agar tou del mateix medi. Les soques antagonistes se sembraven per picada amb l'ajut d'escuradents estèrils al damunt de la sobre capa ja solidificada. Es van realitzar tots els experiments per triplicat, en diferents plaques.

Taula 3.6 Medis de cultiu emprats en la prova d'antagonisme *in vitro*.

Table 3.6 Culture media used in *in vitro* antagonism.

Patogen	Medis assajats
<i>Penicillium expansum</i> EPSF <i>S. vesicarium</i> EPS26	Agar patata dextrosa (PDA) Agar Luria Bertani (LB) Agar Glucosa-Asparagina (GA) Agar Glucosa-Asparagina més Ferro (GA+50 μ M Cl ₃ Fe)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 <i>Erwinia amylovora</i> CU273	Agar B de King (KB) Agar B de King més Ferro (KB+50 μ M Cl ₃ Fe) Agar Luria Bertani (LB) Agar Glucosa-Asparagina (GA) Agar Glucosa-Asparagina més Ferro (GA+50 μ M Cl ₃ Fe)
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 1317.3	Agar B de King (KB) Agar Luria Bertani (LB)

Després d'un període d'incubació (48 h en el cas dels bacteris i 72 h en el cas dels fongs) a 22 °C es determinava la capacitat antagonista de cada soca mesurant l'halo d'inhibició produït al voltant de la colònia. Solament es va tenir en compte la mesura qualitativa de presència/absència d'halos.

3.2.4.2 Bioassaigs d'inhibició de les infeccions causades per diversos bacteris i fongs fitopatògens indicadors

Es va estudiar la capacitat d'inhibir el desenvolupament de la infecció causada per *Erwinia amylovora* CU273 en fruits immadurs de perera, per *Stemphylium vesicarium* EPS26 en fulles de perera i per *Penicillium expansum* en pomes.

En tots els casos es procedia a una primera desinfecció del material mitjançant un rentat amb hipoclorit de sodi (1 % de clor) durant 5 min. Seguidament es realitzaven dos rentats amb aigua corrent durant 2 min i un últim rentat amb aigua destil·lada estèril durant 1 min.

Bioassaig d'inhibició de la infecció per *S. vesicarium* EPS26 en fulles de perera

Es van emprar fulles de perera de la varietat Conference (clon CAV), procedents de plantes autoarrelades de 2 anys d'edat, seleccionant 5 fulles apicals de cada brot i que ja estaven ben desenvolupades, al ser les més sensibles i susceptibles a les infeccions per *S. vesicarium* (Montesinos i col. 1995, Bonaterra 1997). La metodologia seguida correspon a l'emprada per Bonaterra (1997).

Un cop desinfectades les fulles, es tractaven per immersió durant 2 min en una suspensió de les soques antagonistes a una dosi de 10^8 ufc/mL (suspensió realitzada en aigua destil·lada estèril a partir d'un cultiu crescut durant 24 h a 25 °C en agar LB) i realitzant un control negatiu amb fulles banyades solament amb aigua. Les fulles tractades es dipositaven en safates que en la seva base contenien un paper de filtre humitejat amb aigua destil·lada estèril i s'introduïen en bosses d'autoclaui que, posteriorment, se segellaven per mantenir una humitat relativa alta. S'incubaven durant 24 h a 22 °C amb un fotoperíode de 16 h de llum. Cada tractament estava format per 3 repeticions de 3 fulles cadascuna.

A les 24 h després d'haver tractat amb l'agent antagonista es va procedir a la inoculació del patògen mitjançant una suspensió de conidis d'*S. vesicarium* EPS26 a una concentració de $5 \cdot 10^4$ conidis/mL (preparats com en l'apartat 3.2.4.1). Cada fulla s'inoculava en el revers amb 6 gotes de 10 µL de la suspensió de conidis i les safates s'introduïen dins bosses d'autoclaui segellades per evitar la pèrdua d'humitat, incubant-se a les mateixes condicions anteriors (22 °C i fotoperíode de 16 h llum).

La lectura dels resultats es va realitzar a les 48, 64 i 144 h després d'inocular *S. vesicarium*, establint-se els següents índexs per determinar la severitat de les infeccions en cada punt d'inoculació: 0, sense necrosi; 1, 1 sol punt de necrosi; 2, necrosi desenvolupada (varis punts de necrosi que conflueixen); i 3, necrosi molt desenvolupada (ocupant gairebé tota la superfície inoculada). A partir de les dades es calculava l'eficàcia en la inhibició per a cada repetició segons la fórmula:

$$E(\%) = \frac{\sum_1^n I_c - \sum_1^n I_a}{\sum_1^n I_c} * 100$$

on E és l'eficàcia

I_c és l'índex de cada punt d'inoculació del control sense tractar (aigua)

I_a és l'índex de cada punt d'inoculació de les fulles prèviament tractades amb els aïllats essent $n=18$

Bioassaig d'inhibició de la infecció per *Erwinia amylovora* CU273 en fruits immadurs de perera

Per a aquest bioassaig es van emprar fruits immadurs de 10 setmanes de la varietat Passe Crassane recollits d'un camp comercial de la província de Girona i conservats a 4 °C i 100 % d'humitat relativa fins el moment de l'assaig. Després de la desinfecció dels fruits es procedia a la realització de 4 ferides en cada fruit amb l'ajut de puntes de pipeta automàtica de 200 µL. Cada tractament consistia en tres repeticions de 3 fruits cadascuna i 4 ferides per fruit seguint el procediment descrit per Cabrefiga (2000).

En aquest cas, al treballar amb un bacteri de quarantena, va ser necessari extremar les mesures de seguretat en el moment d'inocular el patogen així com les condicions d'incubació. Per aquest motiu es treballava en una campana de seguretat biològica de Tipus II (Nuair Classe II UN-426-400E-USA) i es va autoclavar tot el material en acabar la realització dels assaigs.

Els bacteris que es volien estudiar es van cultivar en 10 mL de brou LB a 22 °C durant 24 h en agitació (125 rpm), se centrifugaven a 5000 g durant 20 min i el sediment es resuspensia en aigua destil·lada estèril fins assolir una concentració de $1-5 \cdot 10^8$ ufc/mL ($A_{620}=0.3-0.4$). Es va realitzar un control negatiu amb fulles banyades solament amb aigua.

Després de tractar el fruits per immersió durant 2 min amb suspensions de les soques antagonistes es dipositaven dins d'alvèols en safates que en la base contenien un paper de filtre humitejat amb aigua destil·lada estèril. Les safates s'introduïen en bosses d'autoclau i se segellaven per mantenir una humitat elevada. El període d'incubació fou de 24 h a 22 °C.

A partir d'un cultiu d'*E. amylovora* CU273 sembrada en agar LB incubada durant 24 h, s'obtenia una suspensió del bacteri a una concentració de 10^8 ufc/mL ($A_{620}=0.2$) i s'inoculaven 10 µL de la suspensió a cada ferida dels fruits, realitzant un control sense inocular el patogen i un control que corresponia a l'immersió en aigua i inoculada amb el patogen. Un cop inoculats els fruits es tornava a segellar la bossa d'autoclau on estava dipositada la safata i s'incubava a 22 °C.

La lectura dels resultats es va realitzar als 5, 6, 7 i 10 dies després de la inoculació, calculant el percentatge d'eficàcia de la inhibició de la infecció per a cada aïllat i cada repetició segons la fórmula:

$$E(\%) = \frac{F_c - F_a}{F_c} * 100$$

on *E* és l'eficàcia.

F_c és el nombre de ferides infectades en el control no tractat amb cap aïllat (aigua).

F_a és el nombre de ferides infectades en el tractament amb l'aïllat.

Bioassaig d'inhibició de la infecció per *Penicillium expansum* en pomes

Es van emprar pomes de la varietat Golden procedents de l'estació experimental de la Fundació Mas Badia (La Tallada d'Empordà) emmagatzemades en fred normal a 1 °C fins el moment de l'assaig. El protocol emprat fou el descrit per Dorca (1998).

Un cop desinfectades les pomes, i partides longitudinalment, es dipositaven dins safates on prèviament s'hi havia posat un paper de filtre humitejat amb aigua destil·lada estèril.

A partir d'un cultiu de l'aïllat crescut de 24 h s'obtenia una suspensió dels bacteris a una concentració de 10^8 ufc/mL ($A_{620}=0.3-0.4$). Es van emprar tres mitjes pomes com a tres repeticions. En cada mitja poma es realitzaven 12 i a cada ferida es dipositaven 50 µL de la suspensió. S'inoculaven 3 de les ferides amb aigua (control) i en les 9 ferides restants, s'inoculaven 3 aïllats (3 ferides per a cada aïllat). Després d'haver introduït les safates en bosses d'autoclau i segellar-les per mantenir una humitat relativa alta, s'incubaven durant 24 h a 15 °C.

Després de 24 h després de la inoculació de l'agent antagonista es procedia a la inoculació del patogen a partir d'una suspensió de conidis de *Penicillium expansum* a una concentració de $5 \cdot 10^4$ conidis/mL (preparats com en l'apartat 3.2.5.1). A cada ferida s'inoculaven 10 µL de la suspensió de conidis i s'introduïen les safates dins bosses d'autoclau. Un cop segellades les bosses (per evitar la pèrdua d'humitat) s'incubaven a les mateixes condicions anteriors (15 °C).

La lectura dels resultats es va realitzar als 5 i 6 dies després d'inocular *Penicillium expansum*. L'eficàcia de cada soca es determinava individualment per a cada fruit mesurant el diàmetre de cada lesió. L'eficàcia de cada antagonista en cada repetició es va calcular amb la següent fórmula:

$$E(\%) = \frac{\sum_1^3 Dc - \sum_1^3 Da}{\sum_1^3 Dc} * 100$$

on E és l'eficàcia.

Dc és el diàmetre de la lesió en els forats de control (inoculat solament amb el patogen).

Da , el diàmetre de la lesió en presència de l'aïllat.

El valor final d'eficàcia s'obtenia calculant la mitjana obtinguda per a les tres repeticions.

3.2.4.3 Bioassaigs de promoció del creixement en plantes

Es va realitzar un bioassaig *in vivo* amb portaempelts de fruiters de les varietats Marianna 2624 (pruner) i GF677 (híbrid natural de presseguer i ametller). Les plàntules, obtingudes per micropropagació *in vitro*, es trobaven en fase d'aclimatació amb humitat relativa alta, en safates de 90 alvèols de 80 cm³ de capacitat amb substrat no estèril. Tot l'experiment es va portar a terme en les instal·lacions dels vivers comercials Agromillora Catalana S.A. situats a la població d'El Rebato (Barcelona). El protocol seguit fou el descrit per Ruz (1999).

A partir de cultius de les soques de 24 h en LB, se sembraven 10 mL de LB líquid incubant-se a 25 °C durant 24 h amb agitació (125 rpm). Seguidament se centrifugava el cultiu a 5000 g durant 20 min i, descartant el sobrenedant, es resuspenien les cèl·lules en tampó fosfat ajustant la suspensió a una concentració de 10⁸ ufc/mL, mantenint-la a 4 °C fins al moment del seu ús.

A cada plàntula s'inoculava 1 mL de la suspensió per reg amb l'ajut d'una pipeta automàtica, realitzant 6 rèpliques per a cada combinació de soca-portaempelt i dins cada safata de 9 soques es deixava un control inoculat amb aigua. Les condicions d'incubació van continuar sent d'humitat relativa alta en el mateix hivernacle del viver comercial.

La lectura dels resultats es va portar a terme als 21 dies després de la inoculació, procedint a mesurar la longitud de la part aèria. La promoció/inhibició del creixement es determinava la relació de la mitjana de les longituds per a cada soca i cada portaempelt en relació a la mitjana dels controls que es trobaven a la mateixa safata, amb la següent fórmula:

$$I = \frac{La}{Lc}$$

on *I* és l'índex de promoció

La és la mitjana de la longitud de la part aèria del portaempelt inoculat amb la soca.

Lc és la mitjana de la longitud de la part aèria del control no tractat.

3.3 Resultats

3.3.1 Identificació mitjançant galeries API 20NE, proves bioquímiques i fisiològiques. Hipersensibilitat en tabac (HR) i activitat nucleadora del gel (INA)

Per a la identificació a nivell d'espècie es van emprar tres sistemes, el sistema API 20NE i dos sistemes basats en proves bioquímiques. D'aquests dos sistemes d'identificació, en les proves bioquímiques 1 s'utilitzava el sistema amb claus dicotòmiques descrites per Digat i Gardan (1987), i, en les proves bioquímiques 2, se seguien els criteris d'identificació descrits per Palleroni (1984).

La lectura dels resultats de les galeries API 20NE es va realitzar a les 24 i 48 h després de la inoculació, mentre que en les proves bioquímiques 1 i 2 se seguien les especificacions de cada n dels mètodes, però, en general, presentaven temps d'incubació més llargs. Els resultats obtinguts en les proves bioquímiques 1 i 2 es mostren a la taula 3.7. Els codis obtinguts per a la identificació amb les galeries API 20 NE així com la identificació resultant en els tres sistemes, es mostren a la taula 3.8.

Cal esmentar que amb l'API 20NE, després de la incubació durant 48 hores, s'observava una reacció lleugerament positiva en la prova de l'esculina, en algunes de les soques. Aquesta reacció lleugerament positiva, si bé s'ha reflectit a la taula 3.8, no es va tenir en compte a l'hora de calcular el codi segons les especificacions del proveïdor, donat que no existia el codi de referència i, per tant, no es podia identificar el perfil obtingut. En la resta de soques es va observar que s'obtenia una millor identificació a les 48 h en lloc de les 24 h. En molts casos es passava de tenir una identificació considerada bona a una d'excel·lent, per aquest motiu, els perfils de la taula 3.9 corresponen a les 48 h d'incubació. Les proves que tenien una lectura positiva a les 48 h i negativa o dubtosa a les 24 h eren en quasi tots els casos les proves de l'arginina dihidrolasa i gelatinasa. Malgrat tot, la identificació de *P. fluorescens* s'assoleix també quan aquestes proves són negatives, si bé amb un % d'identitat inferior, mostrant que aquesta font de variació no afecta d'una manera important el resultat obtingut.

Taula 3.7 Continuació
Table 3.7 Continuation

Soca	Mor	Mot	Gr	PHB	Ox	Piov	41°C	4°C	O/F	AD	D	L	Gel	Lec	Lip	L-ara.	Sor	D-ala	Tre	Sac
532	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
537	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
539	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
550	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
600	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
807	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
808	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
809	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
810	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
811	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
812	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
813	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
814	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
815	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
816	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
818	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
894	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
895	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
944	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1019	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1024	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
1025	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Taula 3.7 Continuació
Table 3.7 Continuation

Soca	Mor	Mot	Gr	PHB	Ox	Piov	41 °C	4 °C	O/F	AD	D	L	Gel	Lec	Lip	L-ara	Sorb	D-ala	Tre	Sac
CECT378	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CECT844	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	nd
CFBP2126	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	nd
CFBP2128	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
CFBP2129	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	nd
CFBP2131	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
2-79	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
M ₄ 80-R	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Q69c-80	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Q ₂ -87	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Q ₄ -87	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CHA0	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
PS 15	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
PS 31	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
WB1	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
WB52	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
BL915	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
JBR1-70	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
JMP12-84	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SBW25	B	+	-	-	+	+	-	+	O	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Mor, morfologia; Mot, mobilitat; Gr, Gram; PHB, acumulació de grànuls de poli-β-hidroxidibutirat; Ox, oxidasa; Piov, pioverdines; 41 °C, creixement a 41°C; 4 °C, creixement a 4 °C; O/F: O metabòlisme oxidatiu, F, metabòlisme fermentatiu; AD, arginina dihidrolasa; D, desnitificació, L, levan; Gel, gelatinasa; Lec, lecitinasa; Lip, lipasa; L-ara, L-arabinosa; Sorb, sorbitol; D-ala, D-alanina; Tre, Trehalosa; Sac, sacarosa; nd, no determinat.
Mor, morphology; Mot, motility; Gr, Gram; PHB, poly-β-hydroxybutyrate accumulated; Ox, oxidase; Piov, pyoverdine; 41 °C, growth at 41°C; 4 °C, growth at 4°C; O/F: O oxidative metabolism, F, fermentative metabolism; AD, arginina dihydrolase; D, denitrification; L, levan; Gel, gelatin hydrolysis; Lec, lecitinase; Lip, lipase; L-ara, L-arabinose; Sorb, sorbitol; D-ala, D-alanine; Tre, trehalose; Sac, saccharose.; nd, not determined.

Taula 3.8 Identificació mitjançant el sistema API 20NE i les proves bioquímiques 1 i 2.
Table 3.8 Identification using the API 20NE system and the biochemical tests 1 and 2.

Aïllat/Soca	API 20NE			Proves bioquímiques 1 (Digat i Gardan 1987)	Proves bioquímiques 2 (Palleroni 1984)
	Perfil	%identitat	Identificació		
CECT378	0047555	99.7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
CECT844	1142457	99.7	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i> A/B	<i>P. putida</i> A
CFBP2126	1047455	92.3	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida-fluorescens</i>	NI
CFBP2128	1156575	92.5	<i>Burkholderia pseudomallei</i> ⁽¹⁾	<i>P. fluorescens</i> III	<i>P. fluorescens</i> III
CFBP2129	1047455	92.3	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida-fluorescens</i>	NI
CFBP2131	1157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
2-79	1157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> C	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
M4-80R	1157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
Q69c-80	1057555	96.6	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
Q2-87	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
Q4-87	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
CHA0	0157455	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> C	<i>P. fluorescens</i> V
Ps15	1057455	99.8	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
Ps31	1157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
WB1	0157557	99.8	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> C	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
WB52	0147555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> C	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
BL915	1157557	99.4	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I ⁽⁴⁾
JBR1-70	1157455	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
JMP12-84	1057455	99.8	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
SBW25	0167555	99.8	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
202	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V
209	1057555	96.6	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V
210	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V
227	0157575	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V
230	0147555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V
263	0156575	82.3	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> C	<i>P. fluorescens</i> V
264	0157577	85.4	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V
288	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V
289	0147557	99.3	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> A/B	NI
298	0057555	99.7	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
301	0357555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
317	1055777	99.3	<i>B. cepacia</i>	<i>P. putida</i> C	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
318	0142457	99.7	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i> A/B	<i>P. putida</i> A
340	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
347	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
356	0157575	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
360	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
372	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	NI	<i>P. fluorescens</i> I
373	1157575	96.9	<i>P. fluorescens</i>	NI	<i>P. fluorescens</i> V
375	0157575	99.9	<i>P. fluorescens</i>	NI	<i>P. fluorescens</i> V
378	0157575	99.9	<i>P. fluorescens</i>	NI	<i>P. fluorescens</i> V
379	1156575	92.5	<i>B. pseudomallei</i> ⁽¹⁾	<i>P. fluorescens</i> III	<i>P. fluorescens</i> III
381	0057575	81.9	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
383	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
384	1157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V
385	0047555	99.7	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V
404	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V
424	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	NI	<i>P. fluorescens</i> I
531	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
532	1157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
537	1157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
539	1157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> V/VI	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
550	1157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
600	0157557	99.9	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> I	<i>P. fluorescens</i> I
807	1157455	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
808	1157455	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
809	1157455	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
810	1057455	99.8	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
811	1157455	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
812	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
813	1057455	99.8	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
814	1057455	99.8	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
815	1157455	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
816	1157455	99.9	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV

Taula 3.8 Continuació
Table 3.8 Continuation

Aïllat/Soca	API 20NE			Proves bioquímiques 1 (Digat i Gardan 1987)	Proves bioquímiques 2 (PalleroNI 1984)
	Perfil	%identitat	Identificació		
817	1057455	99.8	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
818	1157455	99.9	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
894	0157455	99.9	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	NI	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
895	0157455	99.9	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	NI	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
944	0157555	99.9	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	NI	<i>P. fluorescens</i> V ⁽³⁾
1019	0157455	99.9	<i>P. fluorescens</i> ⁽²⁾	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
1024	1057455	99.8	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV
1025	0057455	95.6	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> II/IV	<i>P. fluorescens</i> II/IV

⁽¹⁾ Identificació presumptiva;⁽²⁾ reacció de l'esculina lleugerament positiva a les 48 hores d'incubació;⁽³⁾ es podria classificar com a *P. fluorescens* V però la prova de l'ús de la D-alanina és positiva;⁽⁴⁾ es podria classificar com a *P. fluorescens* I però la prova de l'ús de D-sorbitol és negativa; NI, no identificat

⁽¹⁾ presumptive Identification;⁽²⁾ esculine reaction lightly positive at 48 hour incubation;⁽³⁾ like *P. fluorescens* V but D-alanine use is positive;⁽⁴⁾ like *P. fluorescens* I but D-sorbitol use is negative; NI, no identified.

A la taula 3.9 es mostra un resum del nombre d'aïllats assignats a les espècies de *Pseudomonas* segons cada un dels sistemes de classificació i a la taula 3.10 es reflecteixen els resultats coincidents i no coincidents en els tres sistemes.

En les proves bioquímiques 1, 8 dels aïllats no s'han pogut identificar perquè manca alguna combinació de proves en el diagrama per a la identificació dissenyat per Digat i Gardan (1987). Quant a les proves bioquímiques 2, segons Palleroni (1984), s'han assignat 11 aïllats a *P. fluorescens* biovar V tot i que difereixen en l'ús de la D-alanina i un aïllat com a *P. fluorescens* biovar I tot i que no utilitza el sorbitol (marcades com a (3) i (4), respectivament, en la taula 3.8). Aquesta assignació es va fer a aquestes biovars perquè es van tenir en compte resultats d'altres autors que donen suport a aquesta decisió i que es comenten en la discussió del present capítol.

Taula 3.9 Nombre d'aïllats assignats a les espècies de *Pseudomonas* segons els tres sistemes d'identificació emprats. PB, proves bioquímiques.

Table 3.9 Number of isolates for *Pseudomonas* species depending of the three identification systems used in this study. PB, biochemical tests.

	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> (bv A/B)	<i>P. cepacia</i>	<i>B. pseudomallei</i>	No identificada
API 20NE	67	2	1	2	-
PB 1	61	3	-	-	8
PB 2	67	2	-	-	3

Taula 3.10 Nombre de casos en que la identificació de les soques van ser coincidents o no coincidents segons els tres sistemes emprats.

Table 3.10 Number of coincidents and no coincident identification by the three systems.

Sistema d'identificació	Coincidents		No coincidents
	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> (bv A/B)	
API 20NE- PB 1	58	2	12
API 20NE- PB 2	64	2	6
PB 1- PB 2	59	2	11
API 20NE-PB 1-PB 2	56	2	14

PB, Proves bioquímiques / PB Biochemical tests

Com es pot observar a la taula 3.10, en 58 de les soques s'obté el mateix resultat amb els tres sistemes d'identificació emprats, 56 identificades com a *P. fluorescens* (tenint en compte que amb les proves bioquímiques 1, *P. putida* bv C estava amb anterioritat inclosa a *P. fluorescens* V) i 2, la CECT844 i la EPS318, identificades com a *P. putida*. A la taula 3.11 es resumeixen els resultats obtinguts amb les 14 soques no coincidents en els tres sistemes. S'observa que en les proves bioquímiques 1 romanen 8 aïllats sense poder-se identificar i 3 aïllats en les proves bioquímiques 2 i que els dos sistemes en que hi ha més coincidències són l'API 20NE i les proves bioquímiques 2.

Taula 3.11 Grups de soques amb identificació no coincident pels tres sistemes.

Table 3.11 Groups of strains with no coincident identification by the three systems.

Grup	Soca/aïllat	API 20NE	Proves Bioquímiques 1	Proves Bioquímiques 2
A	EPS317	<i>B. cepacia</i>	<i>P. putida</i> C	<i>P. fluorescens</i> bv. V
B	CECT2128 EPS379	<i>B. pseudomallei</i>	<i>P. fluorescens</i> bv. III	<i>P. fluorescens</i> bv. III
C	EPS372 EPS424	<i>P. fluorescens</i>	Ni	<i>P. fluorescens</i> bv. I
D	EPS373 EPS375 EPS378 894 895 944	<i>P. fluorescens</i>	Ni	<i>P. fluorescens</i> bv. V
E	CFBP2126 CFBP2129	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens-putida</i>	Ni
F	EPS289	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i> A/B	Ni

Ni; no identificat
Ni; no identified

Es pot observar també que els grups amb més discrepàncies entre els tres sistemes d'identificació són els grups A i B. En primer lloc, en el grup A, la soca EPS317 és classifica amb l'API 20NE com a *B. cepacia* mentre que amb els altres sistemes s'identificava com a biovar V de *P. fluorescens*. En segon lloc en el grup B, les soques CFBP2128 i EPS379, identificades amb els API 20NE com a presumptives *B. pseudomallei*, s'identifiquen com a *P. fluorescens* bv. III en els dos esquemes utilitzats basats en proves bioquímiques.

Les soques que formen els grups C i D, identificades com a *P. fluorescens* amb l'API 20NE i amb les proves bioquímiques 2, no es poden identificar segons l'esquema de Digat i Gardan (1987) perquè en el cas de les soques EPS373, EPS375, EPS378 i dels aïllats 894, 895 i 944, que són trealosa i gelatinasa positives, manca la combinació de sacarosa positives i levan negatives. En el cas de EPS424 manca la combinació sacarosa negativa i levan positiu i en el cas d'EPS372, que és trealosa negativa, manca la combinació sacarosa positiva i levan positiva.

Finalment, les soques que es troben en els grups E i F, no van ser identificades per les proves bioquímiques 2. Les dues soques del grup E, la CFBP2126 i CFBP2129, no s'han pogut identificar

al ser gelatinasa negatives i, per tant, no poden ser i assignades a *P. fluorescens* bv. III ni a *P. putida* al mostrar desnitrificació positiva. Aquestes dues soques s'identifiquen com *P. fluorescens-putida* tipus intermig amb les proves bioquímiques 1 i com a *P. fluorescens* amb l'API 20NE. L'altra soca no identificada del grup F és la EPS289 que al ser també gelatinasa negativa no es pot assignar al biovar V de *P. fluorescens*. En aquest cas semblaria que es pot identificar com a *P. putida*, però no concorda el resultat obtingut amb la prova de la D-Alanina que és negativa en EPS289 i en *P. putida* és positiva.

En resum, s'han identificat totes les soques com a *P. fluorescens*, a excepció de CECT844 i EPS318 que s'han identificat com a *P. putida*. Solament una de les soques, l'EPS289, no es va identificar en dos dels tres sistemes emprats. Tot i haver-se identificat les soques CECT844 i EPS318 com a *P. putida*, aquestes es van utilitzar en la resta del treball.

A la taula 3. 12, es mostren els resultats obtinguts en les proves de hipersensibilitat en tabac (HR) i de l'activitat nucleadora del gel (INA) per les soques que van donar positiu en algunes de les proves. Pel que fa referència a la hipersensibilitat en tabac (HR), solament l'EPS372 i l'EPS360 van donar un resultat positiu. En el cas de l'activitat nucleadora del gel (INA), les soques EPS209 i EPS550 van ser positives. Qualsevol d'aquestes dues característiques les fa inviables per poder ser emprades com a agents de biocontrol, però a efectes comparatius, es van continuar emprant en el treball.

Taula 3.12 Soques de *P. fluorescens* que provoquen la resposta hipersensible en tabac (HR) o que són actives en la nucleació del gel (INA).

Table 3.12 *P. fluorescens* strains which produce hypersensitive response in tobacco (HR) or are ice nucleation active (INA)

Soca	HR	INA
EPS209	-	+
EPS360	+	-
EPS372	+	-
EPS550	-	+

3.3.2 Producció de metabòlits

3.3.2.1. Sideròfors, quitinases, àcid 3-indolacètic i cianhídric

Per a la determinació de la producció de quitinases, es va provar un mètode de PCR basat en encebadors per a un gen de quitinases de *Serratia marcescens* però que havien permès detectar també el gen en *Enterobacter*. Malauradament, en les proves que es van dur a terme no es va aconseguir amplificar cap fragment de DNA de les soques *P. fluorescens* BL915 i CHA0, que eren les úniques que sabíem que n'eren productores.

Com era d'esperar, la totalitat de les 72 soques estudiades produeixen sideròfors i un nombre elevat (32) també produeixen HCN. Solament 6 soques de les 72 estudiades, produeixen quitinases i 4 produeixen IAA (Taula 3.13, Figura 3.3).

Taula 3.13 Producció de sideròfors, quitinases, àcid-3-indolacètic i cianhídric per les soques emprades en aquest treball.

Table 3.13 Production of siderophores, chitinases, indoleacetic acid and hydrogen cyanide by the strains used in this study.

Soca	Producció de			
	Siderofors	Quitinases	Àcid 3-	Cianhídric
<i>P. fluorescens</i> CCEP378	+	-	-	-
<i>P. putida</i> CCEP844	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2126	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2128	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2129	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2131	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> 2-79	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> M ₄ 80-R	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> Q69c-80	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> Q ₂ -87	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> Q ₄ -97	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> CHA0	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> Ps15	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> Ps31	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> WB1	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> WB52	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> BL915	+	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> JBR1-70	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> JMP12-84	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> SBW25	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS202	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS209	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS210	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS227	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS230	+	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS263	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS264	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS288	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS289	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS298	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS301	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS317	+	-	-	-
<i>P. putida</i> EPS318	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS340	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS347	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS356	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS360	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS372	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS373	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS375	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS378	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS379	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS381	+	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS383	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS384	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS385	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS404	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS424	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS531	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS532	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS537	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS539	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS550	+	+	-	-

Taula 3.13 Continuació
Table 3.13 Continuation

Soca	Producció de			
	Siderofors	Quitinases	Àcid 3-	Cianhídric
<i>P. fluorescens</i> EPS600	+	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS807	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS808	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS809	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS810	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS811	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS812	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS813	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS814	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS815	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS816	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS817	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS818	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS894	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS895	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS945	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS1019	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS1024	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS1025	+	-	-	+

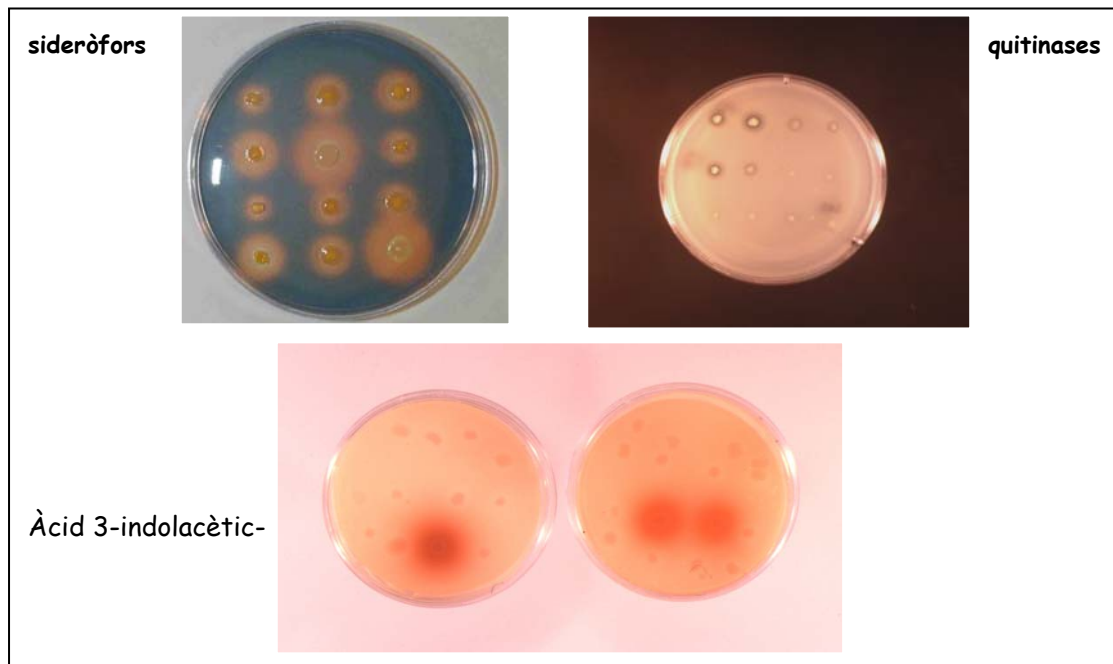


Figura 3.3 Plaques de Petri amb els medis descrits per Schwyn i Neilands, 1987 (sideròfors), Frändberg i Shüner 1998 (quitinases) i Bric i col. 1991 (àcid-3-indolacètic).

Figure 3.3 Petri dishes whit medium cited by Schwyn and Neilands, 1987 (siderophores), Frändberg and Shüner 1998 (chitinases) and Bric *et al.* 1991 (indoleacetic acid).

3.3.2.2 Floroglucinol, àcid fenazin-1-carboxílic i pirrolnitrina

La determinació de la producció de PhI, PCA i Prn es va portar a terme amb les soques que en el capítol 2 s’havien mostrat com a portadores dels gens biosintètics corresponents. La soca *P. fluorescens* SBW25 es va utilitzar com a control negatiu i, per tant, el nombre total de soques en les que es va determinar la producció de cada metabòlit van ser 26 pel PhI, 6 per PCA i 6 per la Prn (Taula 3.14).

Taula 3.14 Producció de Phl, PCA i Prn per les soques de *P. fluorescens* que contenen els corresponents gens biosintètics.

Table 3.14 Production of Phl, PCA and Prn by *P. fluorescens* strains harboring the biosynthetic genes.

Soca	Phl	PCA	Prn
2-79	-	+	-
Q ₂₋₈₇	+	-	-
Q ₄₋₈₇	+	-	-
CHA0	+	-	+
-Ps 15	+	-	-
Ps 31	+	-	-
WB1	nd	-	nd
WB52	nd	-	nd
BL915	-	-	+
JBR1-70	+	-	-
JMP12-84	+	-	-
SBW25	nd	nd	nd
EPS263	-	+	+
EPS 317	+	-	-
EPS807	+	-	-
EPs808	+	-	-
EPS809	+	-	-
EPS810	+	-	-
EPS811	+	-	-
EPS812	+	-	-
EPS813	+	-	-
EPS814	+	-	-
EPS815	+	-	-
EPS816	+	-	-
EPS817	+	-	-
EPS818	+	-	-
EPS 894	-	+	-
EPS 895	-	+	-
EPS 944	-	+	-
EPS 1019	+	-	-
EPS 1023	+	-	-
EPS 1024	+	-	-

+, s' ha detectat ; -, no s' ha realitzat l'extracció; nd, no detectat
+, positive result; -, extraction no realised; nd, not detected

Totes les soques portadores del gen *phlD* van produir Phl en LB suplementat amb glucosa, amb l'excepció de WB1 i WB52. A la figura 3.4 es mostra el cromatograma obtingut tant en el cas del Phl (A) com en la PCA (B). En el cas de la PCA, la totalitat de les soques portadores dels gens biosintètics van produir PCA, observant-se un temps de retenció en l'HPLC idèntic al del patró.

Quant a la determinació de la producció de pirrolnitrina, portada a terme per cromatografia en capa fina (TLC), es va detectar la producció de Prn en el medi assajat (brou nutritiu) en les soques *P. fluorescens* BL915 (control positiu), CHA0 i EPS263. No es va detectar la producció de pirrolnitrina en *P. fluorescens* WB1 i WB52 malgrat haver-se portat a terme dues extraccions i haver-les desenvolupat en dos fases mòbils diferents. A la figura 3.5 es mostren les capes fines dels resultats obtinguts en les dues extraccions independents emprant les dues fases mòbils diferents. Amb el revelador emprat, la pirrolnitrina mostra un color porpra. Amb l'ús de la fase mòbil acetat d'etil-hexà (3:1), l'Rf és de 0.76 i amb cloroform-àcid acètic (95:5) de 0.84.

Figura Cromatogrames obtinguts per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) corresponents a la producció de PhI (soca EPS808) i PCA (soca EPS263).

Figure 3.4 High pressure liquid chromatography (HPLC) chromatograms of strains producing PhI (strain EPS808) and PCA (strain EPS263).

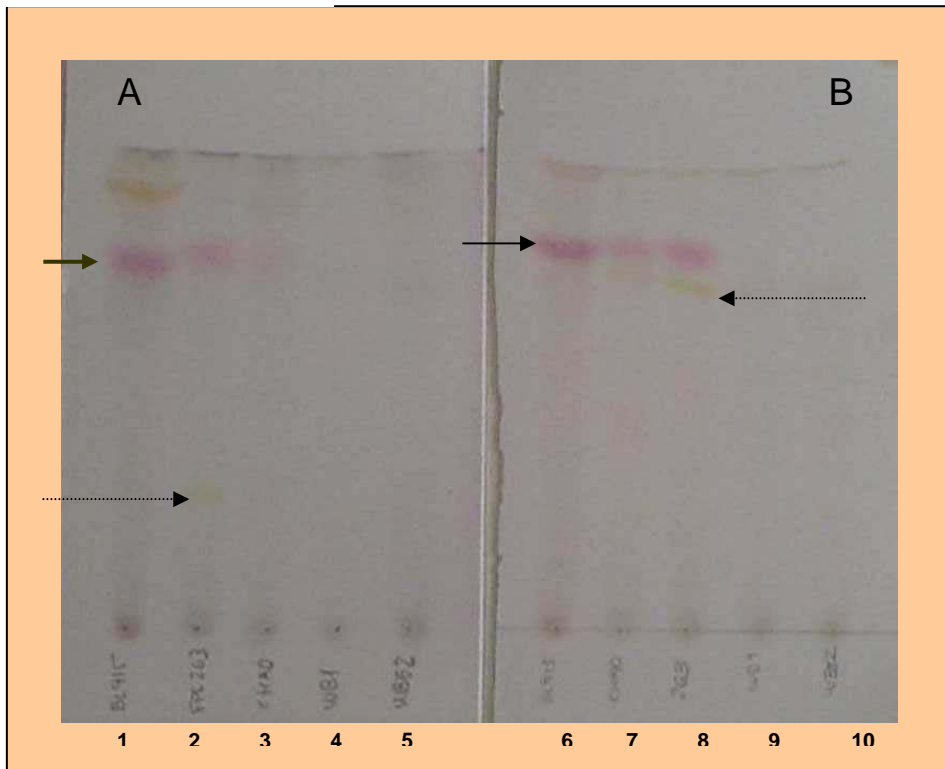
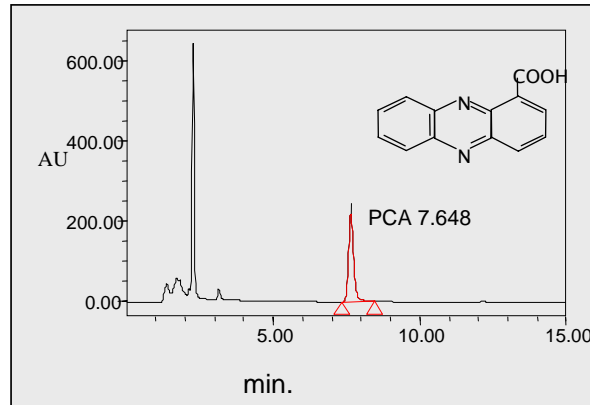
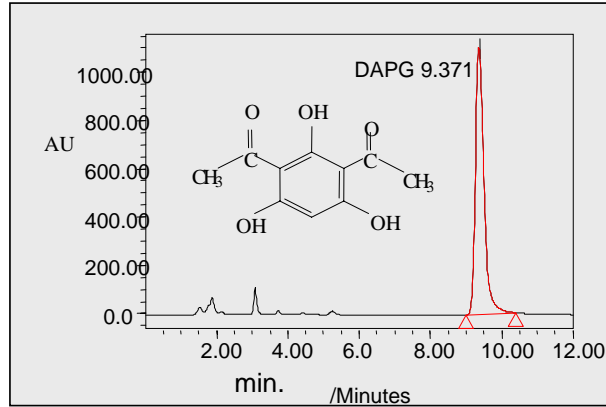


Figura 3.5 Cromatogrames en capa prima corresponents a la producció de Prn per les soques BL915 (1,6), EPS263 (2,8), CHA0 (3,7), WB1 (4,9) i WB52 (5,10) amb diferents fases mòbils: A, acetat d'etil-hexà (3:1) i B, cloroform-àcid acètic (95:5). Les fletxes contínues indiquen la pirrolnitrina i les discontinües la PCA produïda per EPS263 (2,8).

Figure 3.5 Thin layer chromatography corresponding to Prn production by strains BL915 (1,6), EPS263 (2,8), CHA0 (3,7), WB1 (4,9) and WB52 (5,10) developed with: A, hexane:acetone (3:1). and B, CHCl_3 : acetic acid (95:5). Solid lines indicate Pirrolnitrin and dashed lines indicate PCA produced by EPS263 (2,8).

3.3.3 Espectre d'antagonisme *in vitro*, bioassaigs d'inhibició d'infeccions per diversos bacteris i fongs fitopatògens, i promoció del creixement vegetal

3.3.3.1 Espectre d'activitat antagonista *in vitro*

Per a la determinació de la capacitat antagonista de les soques es van emprar diversos microorganismes fitopatògens indicadors, 3 bacteris (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* EPS94, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* 1317.3 i *Erwinia amylovora* CU273) i dos fongs (*Stemphylium vesicarium* EPS26 i *Penicillium expansum* EPSF). L'espectre d'antagonisme s'estudiava en diferents medis de cultiu, pobres en ferro, suplementats amb ferro i en medis més rics com LB. A la figura 3.6 es mostren els halos d'inhibició desenvolupats per algunes de les soques en varis medis i envers diferents antagonistes.

A les taules 3.15 i 3.16 es mostren els resultats obtinguts en els diferents medis enfront els patògens indicadors. Com es pot observar, la majoria de soques (95.8 %) inhibeixen almenys un patògen en un dels medis assajats. Hi ha 57 soques (79.2 %) que mostren antagonisme com a mínim en algun medi contra un bacteri i un fong alhora, 12 (16.7 %) només mostren antagonisme en bacteris, i solament 3 (4.2 %) no mostren antagonisme envers cap patògen en cap dels medis assajats (EPS264, EPS347 i EPS378).

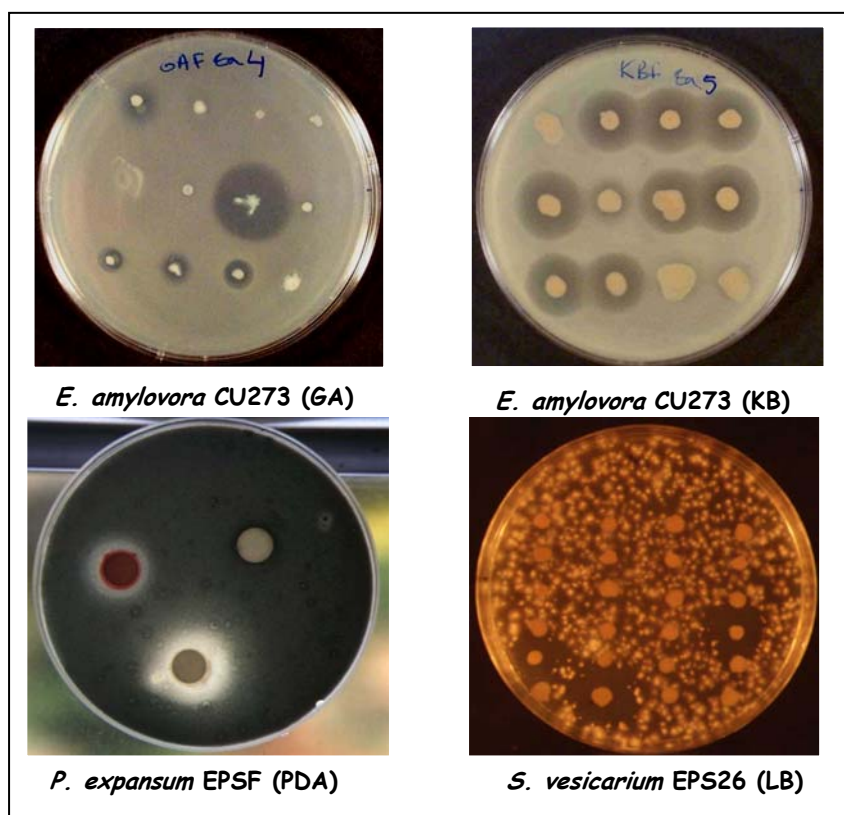


Figura 3.6 Halos d'inhibició desenvolupats per les soques enfront diversos patògens indicadors.
Figure 3.6 Zones of inhibition of growth different pathogens, by several bacterial strains.

Taula 3.15 Antagonisme *in vitro* de les soques envers tres bacteris fitopatògens, en diferents medis de cultiu.

Table 3.15 *In vitro* antagonism of strains against three bacterial pathogens in different culture media.

Soca	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94					<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>lulandis</i> 1317.3		<i>Erwinia amylovora</i> CU273				
	GA	GA+Fe	KB	KB+Fe	LB	KB	LB	GA	GA+Fe	KB	KB+Fe	LB
<i>P. fluorescens</i> CECT378	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>P. putida</i> CECT844	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2126	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2128	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2129	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2131	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> 2-79	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> M ₄ 80-R	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> Q69c-80	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> Q ₂ -87	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> Q ₄ -97	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> CHA0	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> Ps15	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> Ps31	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> WB1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> WB52	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> BL915	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> JBR1-70	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> JMP12-84	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> SBW25	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS202	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS209	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS210	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS227	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS230	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS263	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS264	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS288	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS289	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS298	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS301	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS317	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. putida</i> EPS318	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS340	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS347	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS356	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS360	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS372	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS373	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS375	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS378	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS379	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS381	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS383	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS384	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS385	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS404	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS424	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS531	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS532	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS537	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS539	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS550	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS600	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS807	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS808	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS809	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS810	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS811	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS812	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS813	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS814	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS815	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS816	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS817	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS818	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS894	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS895	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS945	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS1019	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS1024	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS1025	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-

GA, agar glucosa-asparagina; GA+Fe, agar glucosa-asparagina suplementat amb 50µM Fe³⁺; KB, agar B de King; KB+Fe , agar B de King suplementat amb 50µM Fe³⁺; LB, agar Luria-Bertani. +; inhibició del creixement; -, sense inhibició del creixement

GA, glucose-asparagine agar; GA+Fe, glucose-asparagine agar with 50µM Fe³⁺; KB, King B agar; KB+Fe, King B agar with 50µM Fe³⁺; LB, Luria-Bertani agar.
+; positive inhibition; -, no inhibition

Taula 3.16 Antagonisme *in vitro* de les soques envers dos fongs fitopatògens indicadors en diferents medis de cultiu.

Table 3.16 *In vitro* antagonism of strains against two fungal phytopathogens in different culture media.

Soca	<i>Stemphylium vesicarium</i> EPS26				<i>Penicillium expansum</i> EPSF			
	GA	GA+Fe	PDA	LB	GA	GA+Fe	PDA	LB
<i>P. fluorescens</i> CECT378	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>P. putida</i> CECT844	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2126	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2128	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2129	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CFBP2131	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> 2-79	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> M ₄ 80-R	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> Q69c-80	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> Q ₂ -87	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> Q ₄ -97	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> CHA0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> Ps15	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> Ps31	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> WB1	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>P. fluorescens</i> WB52	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>P. fluorescens</i> BL915	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> JBR1-70	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> JMP12-84	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>P. fluorescens</i> SBW25	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS202	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS209	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS210	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS227	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS230	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS263	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS264	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS288	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS289	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS298	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS301	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS317	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. putida</i> EPS318	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS340	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS347	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS356	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS360	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS372	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS373	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS375	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS378	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS379	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS381	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS383	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS384	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS385	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS404	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS424	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS531	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS532	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS537	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS539	+	+	-	+	-	-	+	-
<i>P. fluorescens</i> EPS550	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS600	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS807	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS808	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS809	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS810	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS811	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS812	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS813	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS814	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. fluorescens</i> EPS815	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS816	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS817	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS818	+	+	+	+	+	-	+	+

Taula 3.16 Continuació
Taula 3.16 Continuation

Soca	<i>Stemphylium vesicarium</i> EPS26				<i>Penicillium expansum</i> EPSF			
	GA	GA+Fe	PDA	LB	GA	GA+Fe	PDA	LB
<i>P. fluorescens</i> EPS894	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS895	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS945	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> EPS1019	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS1024	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> EPS1025	+	+	+	+	+	+	+	+

GA, agar glucosa-asparagina; GA+Fe, agar glucosa-asparagina suplementat amb 50µM Fe³⁺; PDA, agar patata-dextrosa; LB, agar Luria-Bertani.

+: inhibició del creixement; -, sense inhibició

GA, glucose-asparagine agar; GA+Fe, glucose-asparagine agar with 50µM Fe³⁺; PDA, potato dextrose agar; LB, Luria-Bertani agar.

+: positive inhibition; -, no inhibition

A la figura 3.7 es pot observar la influència del tipus de medi i del patogen en l'antagonisme desenvolupat. En el cas dels bacteris s'observa que el medi on es troben menys antagonistes vers els 3 patògens assajats és el medi LB (Figura 3.7 A). En el cas de *P. syringae* pv. *syringae* EPS94, el nombre d'antagonistes en agar GA i KB, a l'igual que amb els mateixos medis suplementats amb ferro, és molt similar indicant que la manca de ferro no estimula l'antagonisme. Contràriament, en *E. amylovora* CU273 el major nombre d'antagonistes s'obté en agar KB i tant en aquest medi com en agar GA s'observa una disminució en el nombre d'antagonistes al suplementar el medi amb ferro.

En el cas dels fongs, no hi ha molta diferència en funció del medi assajat, tot i que els medis GA i LB són els que mostren el major nombre de soques antagonistes (Figura 3.7.B)

Hi ha soques que han mostrat antagonisme envers un patogen independentment del medi assajat, com es mostra a la taula 3.17. També hi ha soques que són antagonistes en tots els medis i amb dos dels patògens assajats (tant si es tracta de bacteri/bacteri, fong/fong o bacteri/fong). Solament 5 de les 72 soques produeixen halos d'inhibició en 3 dels 5 patògens en tots els medis assajats (EPS317, EPS372, EPS809, EPS818 i EPS1024) i 2 de les 72 (EPS383 i EPS812) en 4 dels 5 patògens. No hi ha, però, cap soca que sigui capaç d'inhibir tots els patògens alhora en tots els medis assajats.

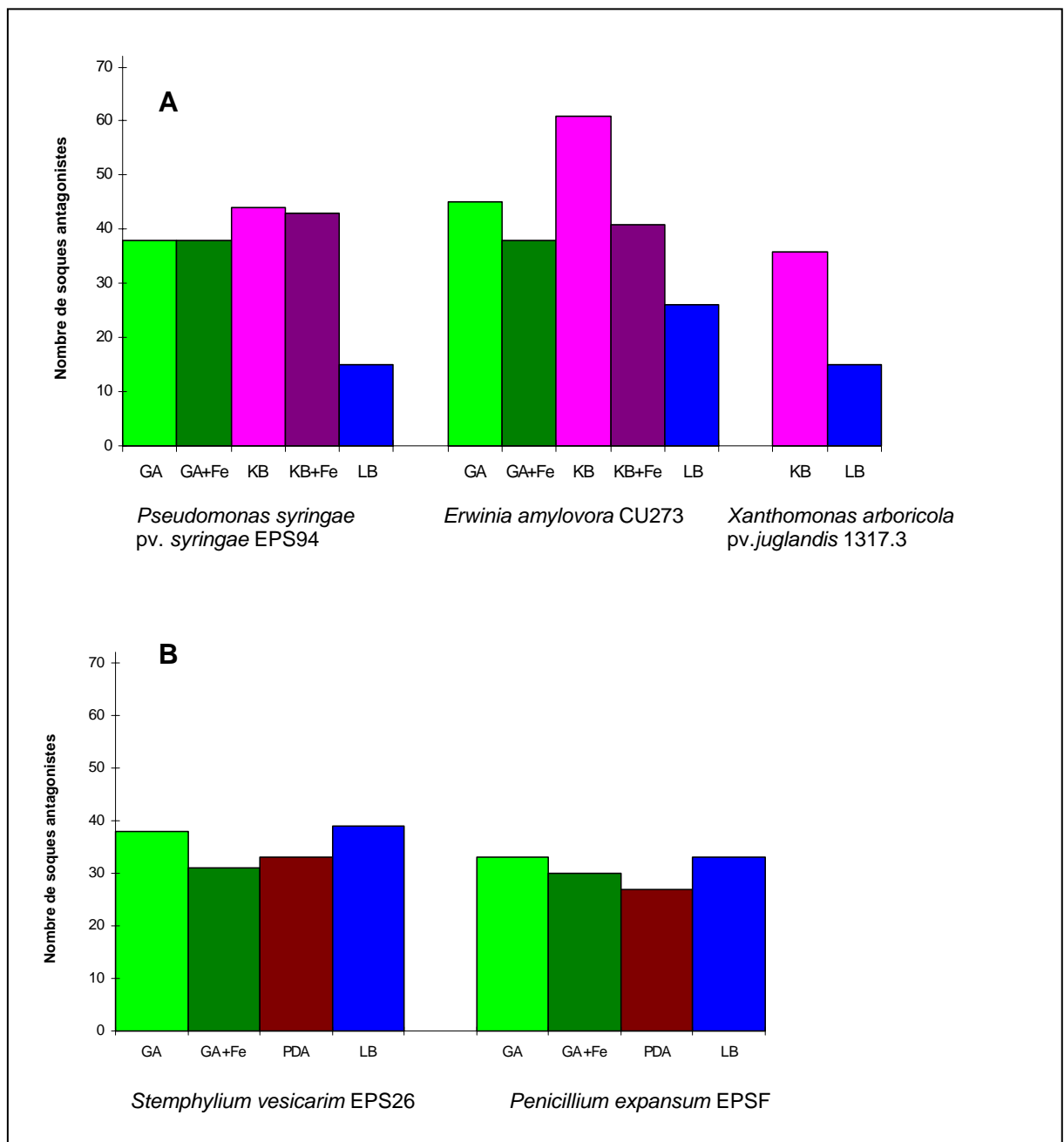


Figura 3.7 Nombre d'aïllats antagonistes envers diversos bacteris (A) i fongs (B) fitopatògens indicadors segons el medi emprat en l'assaig. GA, agar glucosa-asparagina; GA+Fe, agar glucosa-asparagina suplementat amb $50\mu\text{M Fe}^{3+}$; KB, agar B de King; KB+Fe, agar B de King suplementat amb $50\mu\text{M Fe}^{3+}$; LB, agar Luria-Bertani; PDA, agar patata-dextrosa.

Figure 3.7 Number of isolates active against different bacteria (A) and fungal (B) phytopathogens depending on the media used in the assay. GA, glucose-asparagine agar; GA+Fe, glucose-asparagine agar with $50\mu\text{M Fe}^{3+}$; KB, King B agar; KB+Fe, King B agar with $50\mu\text{M Fe}^{3+}$; LB, Luria-Bertani agar; PDA, potato dextrose agar.

Taula 3.17 Soques de *P. fluorescens* que mostren antagonisme *in vitro* en tots els medis de cultiu assajats enfront un o més dels patògens.

Table 3.17 *P. fluorescens* strains which show *in vitro* antagonism in all culture media used against one or more pathogens assayed.

Patogen	Soques
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94	2-79, EPS384, EPS809, EPS810, EPS1024
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 1317.3	Q ₂ -87, Q ₄ -87, Ps31, JMP12-84, EPS383, EPS807, EPS812, EPS817, EPS818, EPS1019.
<i>Erwinia amylovora</i> CU273	Q ₂ -87, Ps15, JMP12-84, EPS317, EPS372, EPS383, EPS812, EPS814, EPS816, EPS818, EPS1024
<i>Stemphylium vesicarium</i> EPS94	CHA0, Ps31, JBR1-70, EPS288, EPS317, EPS372, EPS375, EPS383, EPS550, EPS807, EPS808, EPS809, EPS810, EPS811, EPS812, EPS813, EPS814, EPS815, EPS816, EPS817, EPS818, EPS1025
<i>Penicillium expansum</i> EPSF	CHA0, BL915, EPS288, EPS317, EPS356, EPS372, EPS381, EPS383, EPS531, EPS809, EPS812, EPS1019, EPS1024, EPS1025
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 i <i>E. amylovora</i> CU273	EPS1024
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 i <i>P. expansum</i> EPSF	EPS809, EPS1024
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 1317.3 i <i>E. amylovora</i> CU273	Q ₂ -87, JMP12-84, EPS383, EPS812, EPS818
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 1317.3 i <i>S. vesicarium</i> EPS94	Ps31, EPS383, EPS807, EPS812, EPS817, EPS818
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 1317.3 i <i>P. expansum</i> EPSF	EPS383, EPS812, EPS1019
<i>E. amylovora</i> CU273 i <i>S. vesicarium</i> EPS94	EPS317, EPS372, EPS812, EPS814, EPS816, EPS818
<i>E. amylovora</i> CU273 i <i>P. expansum</i> EPSF	EPS317, EPS372, EPS812, EPS1024
<i>P. expansum</i> EPSF i <i>S. vesicarium</i> EPS94	CHA0, EPS288, EPS317, EPS372, EPS383, EPS809, EPS812, EPS1025
<i>E. amylovora</i> CU273, <i>S. vesicarium</i> EPS94 i <i>P. expansum</i> EPSF	EPS317, EPS372
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 1317.3, <i>E. amylovora</i> CU273 i <i>S. vesicarium</i> EPS94	EPS818
<i>E. amylovora</i> CU273, <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94 i <i>P. expansum</i> EPSF	EPS1024
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> EPS94, <i>E. amylovora</i> CU273 i <i>P. expansum</i> EPSF	EPS809
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 1317.3, <i>E. amylovora</i> CU273, <i>S. vesicarium</i> EPS94 i <i>P. expansum</i> EPSF	EPS383, EPS812

3.3.3.2 Bioassaigs d'inhibició d'infeccions

La capacitat d'inhibir la infecció causada pel bacteri *Erwinia amylovora* CU273 i dos fongs fitopatògens, *Stemphylium vesicarium* EPS26 i *Penicillium expansum* EPSF, es va determinar en fruits immadurs de perera (*E. amylovora*), fulles de perera (*S. vesicarium*) i pomes (*P. expansum*).

A la taula 3.18 es mostren els resultats de l'eficàcia obtinguda per a cada soca en referència a cada patogen. Les soques es van separar en 4 grups segons la seva eficàcia: (1) de 0 a <25 %;

(2) 25 a <50 %; (3), 50 a <75 % i (4) 75 a 100 %. El nombre de soques en cada un dels grups i per a cada patogen es mostren a la figura 3.8. S'observa que el nombre de soques que superen o igualen el 75 % d'eficàcia són relativament poques, 7 (9.7 %) en el cas d'*S. vesicarium* EPS26, 7 (9.7 %) en *P. expansum* EPSF i 15 (20.8 %) en el cas d'*E. amylovora* CU273. A la figura 3.9 es detallen les soques més eficients en cada cas i es pot observar que hi ha una soca, la *P. fluorescens* 2-79 que mostra una elevada eficàcia en tots tres bioassaigs, i 5 soques que són eficients en 2 dels 3 bioassaigs (BL915, CHA0, EPS372, EPS227 i EPS818).

Taula 3.18 Eficàcia de les soques en la inhibició de la infecció enfront a un bacteri i dos fongs fitopatògens indicadors

Table 3.18 Efficacy of strains which show inhibition of infection caused by several bacteria and fungal plant pathogens.

Soca	Biocontrol (%eficàcia)		
	<i>S. vesicarium</i> EPS26	<i>P. expansum</i> EPSF	<i>E. amylovora</i> CU273
<i>P. fluorescens</i> CECT378	50	18	50
<i>P. putida</i> CECT844	56	35	50
<i>P. fluorescens</i> CFBP2126	0	44	25
<i>P. fluorescens</i> CFBP2128	0	30	100
<i>P. fluorescens</i> CFBP2129	47	63	0
<i>P. fluorescens</i> CFBP2131	75	0	72
<i>P. fluorescens</i> 2-79	94	100	88
<i>P. fluorescens</i> M ₄ 80-R	41	80	0
<i>P. fluorescens</i> Q69c-80	39	33	14
<i>P. fluorescens</i> Q ₂ -87	31	31	6
<i>P. fluorescens</i> Q ₄ -97	54	0	6
<i>P. fluorescens</i> CHA0	75	20	100
<i>P. fluorescens</i> Ps15	0	0	19
<i>P. fluorescens</i> Ps31	34	7	13
<i>P. fluorescens</i> WB1	56	10	0
<i>P. fluorescens</i> WB52	62	0	17
<i>P. fluorescens</i> BL915	35	100	75
<i>P. fluorescens</i> JBR1-70	19	7	56
<i>P. fluorescens</i> JMP12-84	32	0	13
<i>P. fluorescens</i> SBW25	56	80	50
<i>P. fluorescens</i> EPS202	6	18	17
<i>P. fluorescens</i> EPS209	0	22	14
<i>P. fluorescens</i> EPS210	43	18	22
<i>P. fluorescens</i> EPS227	75	45	75
<i>P. fluorescens</i> EPS230	22	23	89
<i>P. fluorescens</i> EPS263	18	26	64
<i>P. fluorescens</i> EPS264	40	0	61
<i>P. fluorescens</i> EPS288	62	34	33
<i>P. fluorescens</i> EPS289	54	18	42
<i>P. fluorescens</i> EPS298	61	5	39
<i>P. fluorescens</i> EPS301	60	11	67
<i>P. fluorescens</i> EPS317	9	70	17
<i>P. putida</i> EPS318	40	50	25
<i>P. fluorescens</i> EPS340	64	73	78
<i>P. fluorescens</i> EPS347	20	51	25
<i>P. fluorescens</i> EPS356	60	12	53
<i>P. fluorescens</i> EPS360	72	81	63
<i>P. fluorescens</i> EPS372	75	33	75
<i>P. fluorescens</i> EPS373	75	24	47
<i>P. fluorescens</i> EPS375	60	22	81
<i>P. fluorescens</i> EPS378	7	1	88
<i>P. fluorescens</i> EPS379	7	15	16
<i>P. fluorescens</i> EPS381	41	13	75
<i>P. fluorescens</i> EPS383	22	25	38
<i>P. fluorescens</i> EPS384	60	5	50
<i>P. fluorescens</i> EPS385	4	12	25
<i>P. fluorescens</i> EPS404	15	41	78
<i>P. fluorescens</i> EPS424	30	28	0
<i>P. fluorescens</i> EPS531	65	28	47
<i>P. fluorescens</i> EPS532	7	26	33
<i>P. fluorescens</i> EPS537	28	20	53

Taula 3.18 Continuació
Taula 3.18 Continuation

Soca	Biocontrol (%eficàcia)		
	<i>S. vesicarium</i> EPS26	<i>P. expansum</i> EPSF	<i>E. amylovora</i> CU273
<i>P. fluorescens</i> EPS539	31	19	42
<i>P. fluorescens</i> EPS550	60	52	36
<i>P. fluorescens</i> EPS600	73	17	58
<i>P. fluorescens</i> EPS807	41	10	41
<i>P. fluorescens</i> EPS808	0	8	25
<i>P. fluorescens</i> EPS809	28	15	38
<i>P. fluorescens</i> EPS810	0	16	63
<i>P. fluorescens</i> EPS811	5	18	75
<i>P. fluorescens</i> EPS812	3	5	28
<i>P. fluorescens</i> EPS813	35	10	38
<i>P. fluorescens</i> EPS814	35	12	47
<i>P. fluorescens</i> EPS815	42	16	59
<i>P. fluorescens</i> EPS816	0	20	34
<i>P. fluorescens</i> EPS817	22	12	75
<i>P. fluorescens</i> EPS818	84	6	88
<i>P. fluorescens</i> EPS894	37	56	56
<i>P. fluorescens</i> EPS895	23	89	50
<i>P. fluorescens</i> EPS945	9	85	0
<i>P. fluorescens</i> EPS1019	64	0	8
<i>P. fluorescens</i> EPS1024	32	12	42
<i>P. fluorescens</i> EPS1025	25	15	39

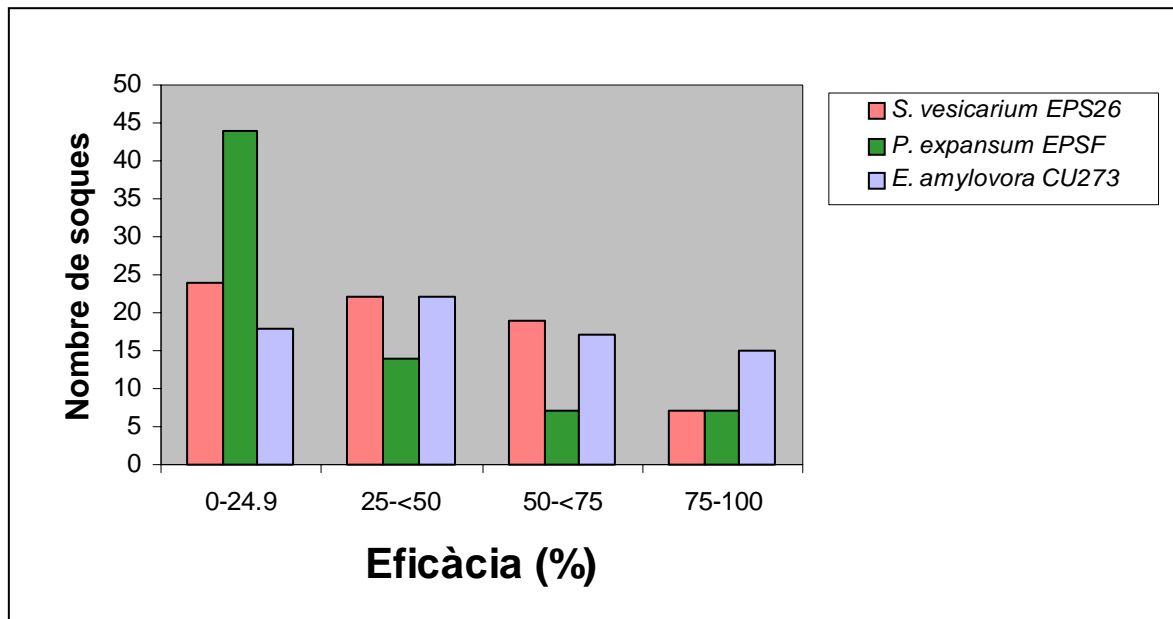


Figura 3.8 Distribució del nombre de soques en funció de l'eficàcia d'inhibició de la infecció per un bacteri i dos fongs fitopatògens.

Figure 3.8 Number of strains according to the efficiency of control of infection caused by several bacteria and fungal pathogens.

Si es comparen els resultats obtinguts per les soques de *P. fluorescens* més eficaces en els bioassaigs i els resultats obtinguts amb l'antagonisme *in vitro* amb el mateix patògen, es pot observar que solament en 5 de les soques hi ha correspondència entre elevat antagonisme *in vitro* en tots els medis i alta eficàcia d'inhibició d'infeccions amb el patògen corresponent. Contràriament, hi ha 7 soques que són molt eficaces en el bioassaig d'inhibició d'infeccions i que no havien mostrat antagonisme *in vitro* enfront el patògen en cap dels medis assajats. Pel que fa

referència a la resta de soques, aquestes havien mostrat inhibició en alguns dels medis assajats enfront el mateix patògen (Taula 3.19).

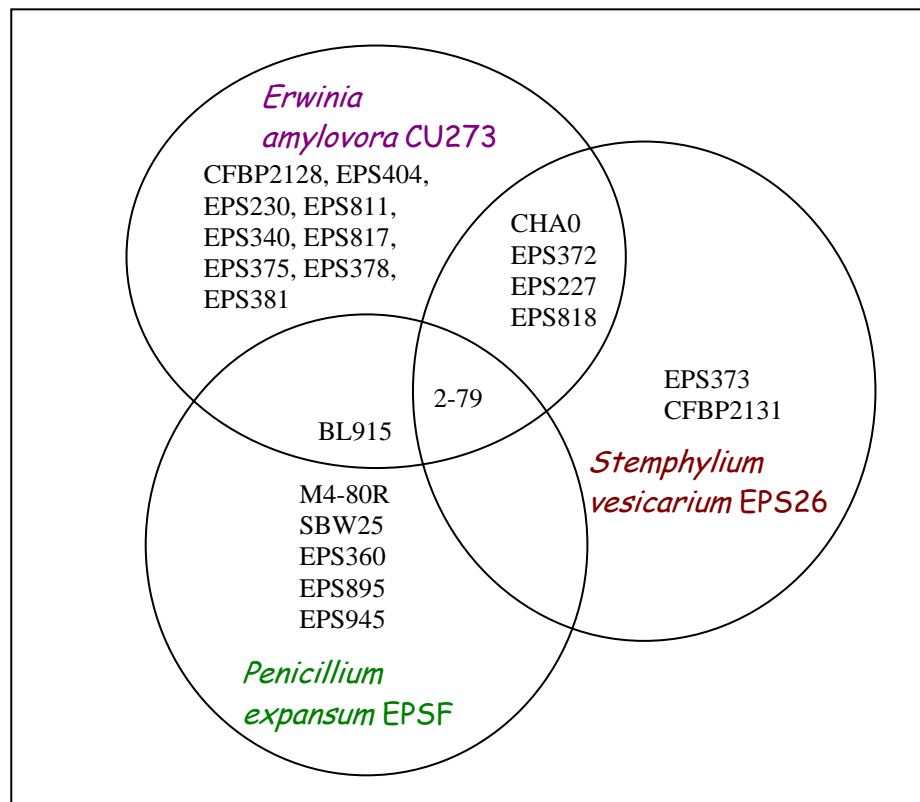


Figura 3.9 Agrupació de les soques de *P. fluorescens* que van mostrar una eficàcia d'inhibició d'infeccions de més o igual a un 75%. En les interseccions es troben les soques que són eficients envers 2 o 3 patògens indicadors.

Figure 3.9 Grouping of *P. fluorescens* strains which show high efficiency ($\geq 75\%$) in inhibiting infections by three plant pathogens. In the intersections there are the strains that are efficient against 2 or 3 pathogens.

Taula 3.19 Característiques de les soques de *P. fluorescens* que van mostrar alta eficàcia d'inhibició d'infeccions en relació a l'antagonisme *in vitro*.

Table 3.19 *P. fluorescens* strains active in inhibiting infections in relation to *in vitro* antagonism.

Inhibició d'infeccions envars	No antagonisme <i>in vitro</i>	Antagonisme <i>in vitro</i> en tots els medis	Antagonisme <i>in vitro</i> en algun medi
<i>P. expansum</i> EPSF	M ₄ 80-R, SBW25, EPS360, EPS895, EPS945	BL915	2-79
<i>S. vesicarium</i> EPS26	2-79	CHA0, EPS372, EPS818	EPS227, EPS373, FBP2131
<i>E. amylovora</i> CU273	EPS378	EPS372, EPS818	CHA0, CFBP2128, EPS227, EPS404, EPS230, EPS811, EPS340, EPS817, EPS375, EPS381, BL915, 2-79

3.3.3.3 Bioassaigs de promoció de creixement vegetal

L'estudi de les soques com a promotores de creixement en plantes es va realitzar en els portaempelts de fruiters Marianna 2624 i GF677, aplicant els bacteris per reg en un viver comercial i mesurant el creixement de la part aèria. Els resultats es presenten com la relació de la longitud de la part aèria entre plantes tractades i plantes control no tractades, i es mostren a la taula 3.20.

Taula 3.20 Efecte de les soques en la promoció del creixement dels portaempelts Marianna i GF677.
Table 3.20 Growth promotion by several strains in Marianna and GF677 rootstocks.

Soca	Portaempelts	
	Marianna 2624	GF677
<i>P. fluorescens</i> CECT378	0,5	1,1
<i>P. putida</i> CECT844	0,9	1,3
<i>P. fluorescens</i> CFBP2126	1,0	1,1
<i>P. fluorescens</i> CFBP2128	1,0	1,7
<i>P. fluorescens</i> CFBP2129	0,9	1,7
<i>P. fluorescens</i> CFBP2131	0,8	1,7
<i>P. fluorescens</i> 2-79	1,6	1,1
<i>P. fluorescens</i> M ₄ 80-R	3,2	1,2
<i>P. fluorescens</i> Q69c-80	2,1	1,7
<i>P. fluorescens</i> Q ₂ -87	2,8	1,5
<i>P. fluorescens</i> Q ₄ - 97	2,3	1,3
<i>P. fluorescens</i> CHA0	2,2	0,6
<i>P. fluorescens</i> Ps15	2,1	1,3
<i>P. fluorescens</i> Ps31	1,7	1,3
<i>P. fluorescens</i> WB1	2,0	1,4
<i>P. fluorescens</i> WB52	2,1	1,3
<i>P. fluorescens</i> BL915	1,4	0,9
<i>P. fluorescens</i> JBR1-70	2,1	1,2
<i>P. fluorescens</i> JMP12-84	2,0	1,3
<i>P. fluorescens</i> SBW25	2,4	1,6
<i>P. fluorescens</i> EPS202	2,3	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS209	0,3	0,3
<i>P. fluorescens</i> EPS210	0,5	0,6
<i>P. fluorescens</i> EPS227	1,2	0,6
<i>P. fluorescens</i> EPS230	1,2	0,7
<i>P. fluorescens</i> EPS263	1,3	0,9
<i>P. fluorescens</i> EPS264	4,2	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS288	1,8	1,5
<i>P. fluorescens</i> EPS289	2,4	1,8
<i>P. fluorescens</i> EPS298	1,9	0,9
<i>P. fluorescens</i> EPS301	1,7	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS317	0,7	1,3
<i>P. putida</i> EPS318	0,8	1,4
<i>P. fluorescens</i> EPS340	1,0	1,2
<i>P. fluorescens</i> EPS347	2,3	0,8
<i>P. fluorescens</i> EPS356	1,5	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS360	1,3	0,9
<i>P. fluorescens</i> EPS372	1,1	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS373	2,5	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS375	2,5	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS378	1,6	0,9
<i>P. fluorescens</i> EPS379	1,1	1,1
<i>P. fluorescens</i> EPS381	2,0	0,9
<i>P. fluorescens</i> EPS383	1,6	1,1
<i>P. fluorescens</i> EPS384	2,3	0,7
<i>P. fluorescens</i> EPS385	2,3	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS404	1,9	0,9
<i>P. fluorescens</i> EPS424	0,8	1,1
<i>P. fluorescens</i> EPS531	1,0	0,8
<i>P. fluorescens</i> EPS532	1,2	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS537	1,1	0,7
<i>P. fluorescens</i> EPS539	2,2	0,8
<i>P. fluorescens</i> EPS550	1,7	1,3
<i>P. fluorescens</i> EPS600	2,8	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS807	1,8	0,8
<i>P. fluorescens</i> EPS808	1,6	1,3
<i>P. fluorescens</i> EPS809	1,6	0,7

Taula 3.20 Continuació
Table 3.20 Continuation

Soca	Portaempelts	
	Marianna 2624	GF677
<i>P. fluorescens</i> EPS810	1,8	0,8
<i>P. fluorescens</i> EPS811	1,7	1,3
<i>P. fluorescens</i> EPS812	1,4	0,7
<i>P. fluorescens</i> EPS813	1,4	1,1
<i>P. fluorescens</i> EPS816	1,4	1,2
<i>P. fluorescens</i> EPS817	1,2	1,1
<i>P. fluorescens</i> EPS818	1,8	1,2
<i>P. fluorescens</i> EPS894	1,2	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS895	1,0	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS945	1,5	0,8
<i>P. fluorescens</i> EPS1019	0,7	1,0
<i>P. fluorescens</i> EPS1024	1,5	1,1
<i>P. fluorescens</i> EPS1025	1,6	1,0

A la figura 3.10 es mostra la distribució del nombre de soques agrupades segons la seva eficàcia en la promoció del creixement vegetal. Es pot observar que hi ha una elevada especificitat de les soques envers el portaempelts emprat en l'assaig. Hi ha més soques que són capaces de promoure el creixement en el portaempelts de prunera Marianna que no en l'híbrid presseguerametller GF677. Només 5 de les soques (Q69c-80, Q₂-87, SWB25, EPS288 i EPS289) mostren un índex superior o igual a 1.5 en ambdós portaempelts. La resta de soques que mostren índexs elevats (superiors a 2.5) en Marianna no mostren influència en GF677 (M₄80-R, EPS264, EPS373, EPS375, EPS600) o inhibeixen el creixement (CHA0). Aquest fet, també s'observa en les soques que en el portaempelt GF677 mostren un índex elevat (1.7) i en canvi en Marianna mostren una clara inhibició (CFBP2128, CFBP2129, CFBP2131). En conclusió, els resultats indiquen que hi ha una alta especificitat entre la soca inoculada i el portaempelt.

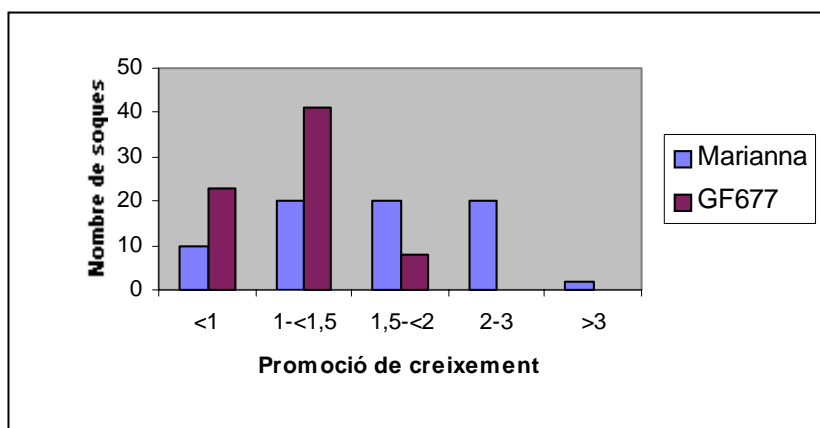


Figura 3.10 Distribució de les soques en funció del nivell de promoció del creixement respecte del control no tractat.

Figure 3.10 Frequency distribution of strains according to the ratio of growth promotion.

3.4 Discussió

3.4.1 Identificació mitjançant galeries API 20NE i altres proves bioquímiques i fisiològiques

La identificació a nivell d'espècie d'aïllats del grup fluorescent de *Pseudomonas* ha estat, i està essent encara avui en dia, objecte de nombrosos treballs. A mesura que s'identifiquen nous aïllats, s'observa una diversitat fenotípica més elevada que l'observada en els primers treballs de taxonomia numèrica iniciats per Stanier i col. (1966). Aquest fet ha propiciat l'aparició de noves claus de determinació que donen un nivell de prioritat a alguna de les proves com la gelatinasa, d'una manera diferent a la considerada en les claus descrites per Palleroni (1984).

En el present treball, i conscients de que es poden obtenir resultats confosos, la identificació s'ha realitzat tant pel mètode de les galeries API 20NE, com per les proves utilitzades en les claus de determinació de Palleroni (1984), i Digat i Gardan (1987).

En conjunt, s'ha obtingut un bon resultat amb l'ús de les galeries API 20NE, malgrat 3 casos que es diferenciaven clarament de la resta: la identificació de CFBP2128 i EPS379 com a presumptives *Burkholderia pseudomallei* i d'EPS317 com a *B. cepacia*. En el cas de CFBP2128 i EPS379, no poden pertànyer a *B. pseudomallei* donat que aquesta espècie acumula grànuls de poli- β -hidroxibutirat, pot créixer a 40 °C però no a 4 °C i aquestes característiques no es donen en CFBP2128 i EPS379. Tot i que, hi ha un seguit de proves en les que les 2 espècies comparteixen el mateix resultat com són lipasa, desnitrificació, sorbitol i D-alanina positives i L-arabinosa negatives. Els altres dos sistemes d'identificació segons Palleroni (1984) i Digat i Gardan (1987) les identifiquen com a *P. fluorescens* bv. III. Hi ha diversos treballs en els que s'han obtingut resultats semblants als nostres, per exemple en el cas de 70 *Pseudomonas* aïllades de llet, 3 es van identificar amb l'API 20NE com a *B. pseudomallei* i 1 com a *B. cepacia*. Contràriament, amb el Biolog es van identificar com a *P. fluorescens* bv. III i I, respectivament (Wiedmann i col. 2000). S'ha de tenir en compte que s'ha descrit també l'existència d'altres aïllats de sòls que es comporten en moltes proves d'una manera semblant i que, en no ser fàcilment identificables, queden com a presumptius, anomenats per alguns autors "*B. pseudomallei*- like organisms" (Palleroni 1982, Bergan 1986).

Pel que fa referència a la soca EPS317, identificada per l'API 20NE com a *B. cepacia*, aquesta no pot ser la seva afiliació. En *B. cepacia* la prova de l'arginina dihidrolasa és negativa, i l'acumulació de PHB i l'ús de L-arabinosa i sorbitol són positives mentre que en EPS317 l'arginina dihidrolasa és

positiva i la resta són negatives. Amb les proves bioquímiques 1 i 2 aquest aïllat s'identifica com a *P. fluorescens* bv. V.

Un altre fet que cal destacar amb la utilització de les galeries API 20NE rau en que alguna de les proves com l'arginina dihidrolasa i la gelatinasa solen tenir una bona lectura a les 48 h i no a les 24 h. La realització de la lectura a les 48 h, però, ha permès trobar algunes soques esculina positives i, si es tenia en compte aquest resultat, el codi d'identificació era inexistent a la base de dades. Per aquest fet, es va prescindir de la prova de l'esculina per relacionar el codi obtingut amb la corresponent identificació. La prova de la hidròlisi de l'esculina sol ser positiva en les espècies *P. maltophilia*, *B. cepacia* *P. vesicularis* i algunes *B. pseudomallei* però, per contra, les tres primeres espècies són arginina dihidrolasa negatives i, a més, totes les espècies acumulen PHB (Bergan 1986). Rainey i col. (1994a) van obtenir també un aïllat classificat com a *P. fluorescens* i altres com a *P. syringae* que presentaven positiva aquesta prova. En el cas del fitopatogen oportunista *P. marginalis*, causant de podridures toves de l'arrel, que és fenotípicament indistingible de *P. fluorescens* bv.II, Sutra i col. (1997) van observar hidròlisi de l'esculina en 3 de 14 soques. En altres espècies bacterianes també s'han descrit resultats variables en aquesta prova, per exemple, s'han descrit soques d'*Erwinia amylovora* (normalment esculina negatives) que són positives (López i col. 1999). Per tots aquests motius, la prova de l'esculina no es va tenir en compte, al no haver estat emprada com a determinativa en la identificació a nivell d'espècie dins el grup de *Pseudomonas* (sensu stricto).

Amb la utilització de les claus determinatives per a la classificació segons Digat i Gardan (1987), s'han trobat aïllats no classificables degut a l'absència d'alguns dels patrons de resultats obtinguts per nosaltres. Aquest fet sol ser freqüent amb l'ús de taules dicotòmiques de classificació, si no hi ha totes les combinacions possibles de dues proves que s'avaluïn conjuntament. Malgrat tot, el resultat obtingut amb la resta d'aïllats a nivell de biovars, tenint en compte el fet de que permet alguna variació respecte a les proves bioquímiques 2 (reclassificació de part del bv. V en *P. putida* bv. C), és molt satisfactori. Amb el sistema de Digat i Gardan (1987) s'aconsegueix identificar alguns aïllats com a *P. fluorescens-putida* que per API 20NE s'identifiquen com a *P. fluorescens* i romanen com a no identificades amb les proves bioquímiques 2.

A vegades, en realitzar les proves bioquímiques, poden observar-se diferències en els resultats obtinguts en aïllats de camp respecte a controls pertanyents a soques tipus de col·lecció. Segons Janse i col. (1992), aquestes diferències poden ser degudes: (i) a les desviacions o errors degut a l'ús de diferents medis, productes químics o en la dificultat d'interpretació de reaccions dubtoses; (ii) al comportament diferencial entre soques aïllades recentment i les de col·lecció; i (iii) que soques procedents de diferents hàbitats i/o origen geogràfic presenten més variacions per les proves que no les soques utilitzades per Palleroni (1984). Aquest mateix autor també opina que tant els aïllats obtinguts en cultius d'enriquiment com els obtinguts per Stanier i col. (1966) poden

ser més uniformes en les característiques fenotípiques que no els aïllats obtinguts a l'atzar a partir de mostres heterogènies.

Quant a les proves bioquímiques 2 (Palleroni 1984), l'aïllat BL915 s'ha assignat al bv. I de *P. fluorescens* malgrat ser sorbitol negatiu, ja que hi ha descrites algunes soques que són sorbitol negatives (Champion i col. 1980). Pel que fa referència a la D-alanina, també s'han descrit *P. fluorescens* bv. V que són positives. Barret i col. (1986) van considerar que no era una prova adequada per diferenciar les soques del bv. V. A més, Digat i Gardan (1987) consideren que, si bé fins ara s'havia donat importància a la prova de la D-alanina (per separar *P. chlororaphis* de *P. aureofaciens*), l'assignació de les dues espècies a *P. chlororaphis* fa del tot innecessària la realització d'aquesta prova com a caràcter decisiu dins el grup fluorescent de *Pseudomonas*. Hi ha una controvèrsia dins l'espècie *P. aureofaciens* ja que la característica més destacada d'aquesta quan va ser descrita per Stanier i col. (1966) era la producció d'àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) però, actualment, s'han inclòs soques dins aquesta espècie basant-se en el perfil d'àcids grassos, malgrat que no produeixen PCA. Al 1989, Johnson i Palleroni van proposar que aïllats caracteritzats com a *P. aureofaciens* s'inclouessin en *P. chlororaphis*, que produeix un derivat del grup de les fenazines, la clororanfina. Amb tots aquests canvis, hi ha autors com Pierson III (1998) que fan referència a soques identificades com a *P. aureofaciens*, per exemple *P. aureofaciens* Q₂₋₈₇ en referir-se a *P. fluorescens* Q₂₋₈₇, tot i que aquestes soques estiguin citades com *P. fluorescens* en la resta de bibliografia.

En el cas de les proves bioquímiques 2 en el nostre treball, es va decidir no emprar una clau dicotòmica perquè, si bé són molt útils al laboratori, sol succeir que manquen algunes de les possibles combinacions que poden sorgir. Per això, en el cas de les proves emprades per diferenciar entre biovars de *P. fluorescens* i altres espècies de *Pseudomonas* (sensu stricto), nosaltres vàrem preferir avaluar el conjunt de característiques. De les 3 soques que no es van poder classificar, totes ho van ser per presentar la prova de la gelatinasa negativa. La majoria d'autors han inclòs tots els aïllats gelatinasa negatius en l'espècie *P. putida*. Cal comentar, però, que ja en els treballs d'Stanier i col. (1966) es va separar *P. putida* en dos biotips (A i B) i es considerava que el biovar B estava més relacionat amb *P. fluorescens* que amb *P. putida*. Més endavant, Digat i Gardan (1987) van proposar el biovar C dins *P. putida* que amb anterioritat havia estat inclòs al biovar V de *P. fluorescens*. Un altre resultat que cal comentar del nostre treball és el fet de que cap de les soques de col·lecció que s'havien obtingut com a representants dels biovars II/IV de *P. fluorescens*, no han estat classificades pels dos sistemes bioquímics com a tals. No sols per presentar negativa la prova de la gelatinasa, sinó perquè la producció de levans també ha estat negativa.

Hi ha dues proves, la lipasa i lecitinasa, que es van incloure en les proves bioquímiques, perquè varis autors els hi han donat molta importància. N'obstant, en el treball de Wiedmann i col. (2000) es van trobar que alguns aïllats identificats com a *P. putida* per Biolog i API són lipasa negatius i

lecitinasa positius; altres *P. fluorescens* pels dos sistemes, són lipasa positives/negatives i lecitinasa positives. Però el més curiós és que els aïllats identificats pels dos sistemes com a *P. putida* eren negatius i els identificats com a *P. fluorescens* eren positius per les dues proves. Això fa pensar que potser només les soques típiques donen en ambdós sistemes de classificació positiu en les dues proves. Aquestes proves encara s'utilitzen actualment, però potser no tenen molt valor en la separació entre *P. putida* i *P. fluorescens*.

Cal citar també el resultat obtingut amb CECT844 dipositada com a *P. fluorescens*, que tant amb l'ús de les galeries API 20NE com de les proves bioquímiques, ha estat identificada com *P. putida*. El fet de que una soca procedent d'una col·lecció de cultius s'identifiqui diferent al que s'espera no és infreqüent. Janse i col. (1992) van identificar com a *P. putida* soques trameses com a *P. aeruginosa* (PD1546) i *P. fluorescens* (PD1555) procedents de la col·lecció de cultius del Servei de Protecció dels Vegetals Holandès (Culture Collection Plant Protection Service, Wageningen, The Netherlands). S'han descrit altres casos en treballs que fan referència a bacteris fitopatògens; per exemple, soques trameses com a *E. amylovora* (per LMG, Laboratory of Microbiology, Gent, Belgium) van ser reclassificades com a *Pseudomonas* (Maes i col. 1996).

Malgrat tots els esforços esmerçats en la classificació i identificació de *Pseudomonas* (sensu stricto) amb la utilització dels sistemes API i Biolog, aquests han mostrat sols ser efectius en un limitat nombre de casos per la identificació d'aïllats procedents de mostres naturals. De 300 aïllats fluorescents emprats en el treball de Frey i col (1997), 14 van restar sense identificar amb l'ús del mètode Biolog. Amb les galeries API 20NE, Rainey i col. (1994a) no van poder identificar 8 dels 30 aïllats fluorescents amb els que treballaven, acabant d'identificar-los amb les característiques descrites per Palleroni (1984), d'una manera similar a la identificació final que s'ha realitzat en el nostre treball. Gill i col. (1994) en un conjunt de 86 soques, van identificar-ne 68 com a *P. fluorescens* o *P. putida* i la resta van romandre sense identificar.

Segons els resultats obtinguts amb els diferents mètodes d'identificació utilitzats en el nostre treball, es pot dir que en general s'obté un bon resultat amb l'ús de les galeries API 20NE, tot i que no es pot arribar a classificar en els diferents biovars de *Pseudomonas fluorescens*. Depenent de la necessitat de classificació en biovars, es pot pensar en realitzar solament les proves de desnitrificació i levans, que permeten separar de manera ràpida els biovars I, II/IV, III i V. Si el que es pretén és solament descartar les soques de *P. putida*, la utilització de les galeries és molt més ràpida i molt menys laboriosa que la realització de les diferents proves bioquímiques per separat. Malgrat que hi ha altres sistemes d'identificació com el Biolog o el perfil d'àcids grassos (FAME), aquests sistemes (inclusivament l'API) estan sotmesos a les limitacions de les biblioteques taxonòmiques que s'empren en la classificació. Per aquest motiu s'han donat casos en que una mateixa soca és identificada en espècies diferents per varis sistemes. En aquest sentit, en el cas de la tècnica FAME, *P. fluorescens* Q₂₋₈₇, CHA0, 2-79, i F-113 han estat classificades com a *P.*

aureofaciens, *P. putida* bv. A, *P. marginalis* i *P. savastanoi*, respectivament (Harrison i col. 1993, Ellis i col. 2000).

3.4.2 Producció de metabòlits

Per a la determinació de la producció de quitinases es van emprar dues aproximacions diferents, una aproximació fenotípica mitjançant l'anàlisi de l'activitat quitinolítica i una altra molecular amb la cerca dels gens que les codifiquen. Aquesta darrera aproximació no va donar resultat satisfactori, la qual cosa és bastant lògica si pensem que els encebadors que es van emprar estaven dissenyats en base a quitinases de *Serratia* tot i haver-se mostrat efectius en la detecció de quitinases en *Enterobacter* (Chernin i col. 1997). En el nostre cas, caldria haver disposat de seqüències que pertanyessin a quitinases de *Pseudomonas* amb l'objectiu de dissenyar encebadors dirigits a segments altament conservats entre diferents soques. Aquesta aproximació ha estat emprada per Ramaiah i col (2000) per detectar gens que codifiquen per quitinases de bacteris en ambients marins. A partir de les seqüències dels gens de quitinases de diferents espècies com *Serratia*, *Enterobacter*, *Alteromonas*, *Klebsiella*, *Vibrio* i *Bacillus*, que eren força divergents, van dissenyar encebadors dirigits a regions molt conservades, aconseguint detectar quitinases en un ampli ventall d'espècies.

El nombre de soques productores de quitinases detectades en el nostre treball (6 de 72, de les quals solament 4 corresponen a soques pròpies) és relativament baix. Frandberg i Schnürer (1998) van aïllar bacteris en gra de cereal emmagatzemat i van obtenir al voltant d'un 0.5 % d'aïllats quitinolítics entre els bacteris aeròbics. Entre aquests, un 80 % pertanyia al gènere *Pseudomonas*, i dins els Gram positius van aïllar bacteris dels gèneres *Bacillus*, *Corynebacterium* i *Streptomyces*. Tot i no ser comparables els nostres resultats amb els d'aquests autors en quant a la procedència de les mostres, si que es pot esmentar que la selecció prèvia de 32 aïllats que presentaven antagonisme envers bacteris i fongs fitopatògens en el treball de Bonaterra (1997), feia esperar un nombre superior de bacteris productors de quitinases. Les soques que mostren activitat quitinolítica pertanyen als biovars I i V, resultat que coincideix amb l'obtingut per Nielsen i col. (1998) els quals, després de realitzar una preselecció de candidats a agents de biocontrol entre un grup de soques pertanyents a *P. fluorescens*, detecten activitat quitinolítica en 17 d'un total de 47, destacant que pertanyien als biovars I, III i V. Però realment, sembla que no hi ha una relació entre la producció de quitinases i el biovar i, tanmateix, no es pot relacionar tampoc amb altres característiques fenotípiques.

La metodologia emprada en el nostre treball per posar de manifest la producció de quitinases, descrita per Frandberg i Schnürer (1998) i basada en determinar la producció de quitinases sense una inducció prèvia de l'activitat quitinolítica, ha mostrat ser efectiva i de fàcil avaluació. Malgrat tot, l'èxit de la metodologia rau en la correcta preparació de la suspensió de quitina col·loïdal, doncs s'ha observat que en algun cas no s'aconsegueix una suspensió col·loïdal de qualitat

satisfactoria. Per tant, és important disposar d'una soca productora de referència que serveixi com a control positiu i assajar-la en cada nova preparació del medi.

Quant a la producció d'àcid 3 indolacètic (IAA), el nombre de soques productores detectades ha estat semblant al de les quitinases ja que, d'un total de 4 soques productores, n'hi ha 3 de pròpies que produeixen IAA en quantitat suficient per ser detectat. En aquest cas, no podem comparar els nostres resultats amb els d'altres autors, però si cal fer esment que en altres espècies de *Pseudomonas*, com *P. syringae* i *P. savastanoi*, està descrit que hi ha soques productores d'aquest metabòlit (Lindow i col. 1998, Hirano i Upper 2000, Penyalver i col. 2000).

Pel que fa a la producció de HCN, 32 de les 72 soques en són productores i cal destacar que podem distingir tres grans grups en referència a altres productes sintetitzats alhora per les soques. El primer grup i més nombrós està format per 23 soques que són productores de PhI i HCN; un segon grup està format solament per 2 soques que produeixen HCN i que, malgrat posseir els gens biosintètics per a la producció de PhI, no se n'ha detectat la producció; i, finalment, un tercer grup de 6 soques que solament produeixen HCN. La producció de PhI lligada a la de HCN s'ha descrit en diversos treballs que s'han portat a terme amb aïllats de diferents orígens geogràfics (Keel i col. 1996, Nielsen i col. 1998). De fet, també s'ha demostrat la regulació de la producció d'ambdós metabòlits per sistemes de regulació de dos components, en algunes de les soques com la CHA0. En un primer moment, es va anomenar a la proteïna sensora d'aquest sistema GacS per referir-se a un regulador global de la producció d'antibiòtics i control de la producció de HCN (Laville i col. 1992, Carruthers i Haas 1997, Blumer i Haas 2000a).

En les darreres dues dècades, han estat aïllades de diferents sòls i orígens geogràfics moltes soques del grup fluorescent de *Pseudomonas* productores dels antibiòtics PCA, PhI i Prn, (Fenton i col. 1992, Rosales i col. 1995, Keel i col. 1996, McSpadden i col. 2001, Picard i col. 2000). La producció d'aquests antibiòtics ha mostrat tenir importància en el control biològic que s'observa en els sòls supressius naturals (Weller i col. 1988, Keel i col. 1992, 1996). Com a resultat, la recerca de soques productores d'aquests antibiòtics és en l'actualitat una de les fites més importants en els treballs de control biològic que utilitzen bacteris.

Per aquest fet i tal com s'ha descrit en el capítol anterior, un dels objectius del nostre treball era disposar de soques productores d'aquests metabòlits alhora de portar a terme la resta d'objectius plantejats. Amb els resultats obtinguts en el Capítol 2, es va constatar que es disposava de soques pròpies portadores dels gens biosintètics dels 3 antibiòtics i, per tant, la detecció de la seva producció es va realitzar solament en aquest conjunt de soques.

Els resultats obtinguts coincideixen majoritàriament amb els esperats en el sentit de produir el metabòlit quan s'ha detectat la presència dels gens, excloent solament els obtinguts amb *P.*

fluorescens WB1 i WB52. En aquestes dues soques, portadores dels gens biosintètics de Phl i Prn, no es va poder detectar cap dels dos metabòlits en les condicions assajades. Els motius que es poden apuntar per explicar aquest fet són, per una banda, les condicions de l'assaig i, per l'altra, podria ser degut a mutacions en els gens reguladors o biosintètics.

Fent referència al primer dels motius citats, podria haver succeït que el medi assajat en aquest treball no fos el més adient, de manera que la quantitat produïda hagués estat molt minsa i per sota del límit de detecció del mètode analític. Keel i col. (1996) i Mavrodi i col. (2000,2001) indiquen que les condicions del cultiu que permeten la detecció de la producció de Phl en la majoria de soques, no és vàlida per a alguna soca concreta. En ambdós treballs, els autors no poden detectar la producció de Phl per *P. fluorescens* CHA0 emprant el medi KB, mentre que sí que la van detectar en medi Malta. Si bé en el nostre treball solament es va emprar el medi LB suplementat amb glucosa, en altres treballs portats a terme per investigadors del nostre grup de recerca amb diferents medis (LB, LB suplementat amb glucosa, KB, GA, i Malta en líquid i sòlid) no s'ha pogut detectar Phl en les soques *P. fluorescens* WB1 i WB52 (Alemany, comunicació personal).

Quant al segon motiu citat, el metabolisme secundari en *P. fluorescens* està regulat globalment pel sistema de dos components GacA/GacS (Laville i col. 1992, Carruthers i Haas 1997, Blumer i Haas 2000a). S'ha descrit que una mutació espontània en un d'aquests gens bloqueja la síntesi dels compostos HCN, Prn i Phl, augmentant la producció d'àcid salicílic en *P. fluorescens* CHA0 (Duffy i Défago 2000). També s'ha demostrat que la freqüència de mutació en ambdós gens és similar, indicant que la pressió selectiva pels dos tipus de mutants és semblant. En el nostre cas, el fet que WB1 i WB52 produeixin HCN, fa pensar que la mutació podria no estar localitzada en els gens reguladors globals sinó més aviat en els gens biosintètics implicats en la biosíntesi de Phl, ja que mutants en aquests gens, com *P. fluorescens* Q₂₋₃₇::Tn5-1, són capaços de produir cianhídric però no Phl (Fenton i col. 1992, Keel i col. 1996). Un factor que s'ha de tenir en compte en aquestes dues soques és la producció d'àcid salicílic. Si bé la determinació de la producció no s'ha realitzat en el nostre treball, aquestes han estat referenciades com a productores. Aquest fet tindria la seva influència si se considera que Duffy i Défago (2000) van demostrar que la mutació en els gens reguladors *gacA* i *gacS* provoca un augment de la producció d'àcid salicílic i, segons Blumer i Haas (2000a), la producció de HCN està més influenciada per altres reguladors diferents. Per tant, seria raonable pensar en aquest cas concret que realment sigui una mutació a nivell dels gens *gacA/gacS* que no dels altres reguladors de la producció de HCN. La taxa alta de mutació en els gens *gacA* i *gacS* descrita per Duffy i Défago (2000) justificaria el fet que, tot i tenir els gens biosintètics necessaris per a la producció de Phl, les soques WB1 i WB52 no produïssin aquest metabòlit.

Contràriament al que succeeix en les soques WB1 i WB52, que produeixen HCN i no Phl, una de les productores de Phl, l'EPS317, ha mostrat no ser productora de HCN. Una possible explicació

seria la presència d'una mutació en altres gens reguladors a un nivell diferent de *gacA/gacS*, com ara en els gens *anr* que regulen la cianhídric sintetasa. En aquest sentit, Blumer i Haas (2000a) han demostrat que en la producció de HCN per *P. fluorescens* CHA0 és més important la regulació que exerceix *anr*, que a la seva vegada està regulada pel ferro, que no la regulació pel gen *gacA*.

3.4.3 Espectre d'antagonisme *in vitro*, inhibició d'infeccions per diversos bacteris i fongs fitopatògens, i promoció del creixement vegetal

Amb la finalitat d'obtenir una bona caracterització de les soques en relació al seu possible ús com a agents de biocontrol, es van realitzar assaigs per determinar l'activitat dels aïllats tant en experiments *in vitro* com *in vivo*.

Els experiments *in vitro* han estat emprats clàssicament a l'hora d'avaluar l'activitat de les soques enfront diferents patògens. La rapidesa i economia, tant de material com de temps, fan que aquests assaigs puguin ser un pas previ dels experiments *in vivo*. Malgrat la manca de correlació que s'ha observat entre els assaigs *in vitro* i *in vivo* en alguns casos (Wei i col. 1991, Andrews 1992, Bonaterra 1997, Ellis i col. 2000, Landa i col. 2001) també hi ha treballs en què s'ha obtingut una bona correlació (Berg i col. 2000). En la determinació de l'antagonisme en el nostre treball, s'ha obtingut un nombre elevat de soques que mostren ser antagonistes *in vitro* dels diferents patògens indicadors. Tot i que s'havien escollit 17 soques pròpies com a controls negatius de les (és a dir, no antagonistes) tenint en compte el treball de Bonaterra (1997), solament 3 (4.2 %) no produeixen halos d'inhibició envers cap patògen en cap dels medis assajats. La resta de soques (95.8 %) inhibeixen almenys un patògen en algun dels medis i més d'una tercera part de les soques (79.2 %) mostren antagonisme contra un bacteri i un fong alhora.

La preselecció a que s'havien sotmès les soques, procedents del treball de Bonaterra (1997), les cedides per altres investigadors (la majoria productores d'algun metabòlit) i les aïllades en el present treball portadores de gens biosíntetics per a la producció de diferents metabòlits, fa que no sigui possible establir comparacions dels percentatges obtinguts amb altres treballs. Per exemple, Kim i col. (1997) troben un 15.5 % (entre un total de 2000), Becker i Cook (1988) un 7 % (entre 5000) i Berg i col. (2000) un 6.6 % (entre 300) d'aïllats capaços de produir halos d'inhibició enfront els patògens indicadors.

El nombre de soques capaces de provocar halos d'inhibició i la intensitat d'aquests respecte als diferents patògens assajats és variable. Algunes soques sols provoquen grans halos d'inhibició en algun dels medis mentre d'altres provoquen petits halos en la majoria de medis. Cal tenir en compte que el diàmetre de l'halo d'inhibició pot també estar relacionat amb les propietats de

difusió del metabòlit i, per tant, un metabòlit molt actiu amb poca capacitat de difusió pot generar un halo d'inhibició molt petit i a l'inrevés.

Hi ha més soques capaces d'inhibir el creixement dels bacteris que no dels fongs. Una de les teories que pot explicar aquest resultat és la teoria de la bala i la diana. En el cas dels bacteris patògens, la mida entre l'antagonista i el patògen és similar i, per tant, s'estableix una competició més igualada on els antagonistes poden resultar més eficaços. En el cas dels fongs patògens, la mida és superior, representant ja un entrebanc en l'establiment de la competència i moltes vegades cal un nombre molt elevat de cèl·lules antagonistes per obtenir una eficàcia acceptable (Montesinos i Bonaterra 1996). Un exemple clar d'aquesta desigualtat en la competència que es pot establir entre un fong i un bacteri va ser mostrada per Frändberg i Schnürer (1998) els quals, emprant bacteris productors de quitinases, van observar que si el tractament amb el bacteri es realitzava 48 hores abans de l'aplicació del fong es podia assolir un 98 % d'inhibició, mentre que sols s'assolia un 43 % sense preincubació, atribuint-se aquest fet a una major població bacteriana després de la preincubació.

Els factors que més influència mostren en els assaigs d'antagonisme *in vitro* són el medi de cultiu emprat i el patògen indicador (Wei i col. 1991). En aquests tipus d'assaigs, el mecanisme que es posa més de manifest és la producció de substàncies antibiòtiques i la seva síntesi ha mostrat ser en ocasions depenent del medi. En el cas de la producció de Phl té importància la glucosa. En algunes soques s'ha vist que la seva presència actua com a inhibidor (Shanahan i col. 1992) i en altres com estimulador (Nielsen i col. 1998). Una quantitat de 0.6 % de glucosa és suficient per reprimir la producció de quitinases induïbles, però no s'observa aquest fet si la quantitat de glucosa és del 0.12 % (Frändberg i Schnürer 1998). S'ha demostrat també que és necessària la presència de ferro per a la síntesi del HCN (Keel i col. 1989) o, contràriament, cal l'absència de ferro per a la producció de sideròfors (Loper 1988). De manera no tant concreta, s'ha descrit també que la presència d'aminoàcids en el medi inhibeix la producció de bacteriocines (Vanneste i col. 1992) i que la disponibilitat de precursors estimula la producció de determinats metabòlits com en el cas del triptòfan per a la Prn (Leisinger i Magraf 1979) o de la glicina pel HCN (Wissing 1974). Hi ha, però, descrits alguns metabòlits, com la viscosinamida, la producció dels quals és independent del medi en que estigui creixent la soca (Nielsen i col. 1998).

L'efecte del tipus de medi de cultiu en la síntesi de metabòlits fa que en el nostre treball s'hagi optat per l'ús dels medis GA, KB i LB en bacteris i GA, PDA i LB en fongs. Amb l'ús dels diferents medis es va pretendre afavorir la màxima diversitat de producció de tipus de metabòlits. El medi GA és un medi ric en glucosa, pobre en ferro i que conté com a únic aminoàcid l'asparagina. El medi KB té un alt contingut en aminoàcids (peptona), no conté glucosa i és pobre en ferro. Finalment, el medi LB conté molts aminoàcids (extracte de llevat i triptona), poca glucosa i molt ferro. Alhora, i per a posar de manifest la importància del ferro, es va addicionar aquest als medis pobres en ferro (GA i KB). En el cas de l'ús de *Xanthomonas* com a indicador no es va emprar el

medi GA perquè no afavoria el seu creixement. Amb l'ús dels diferents medis es va pretendre afavorir la màxima diversitat de producció de tipus de metabòlits.

Hi ha dos aspectes a tenir en compte a l'hora d'interpretar els resultats obtinguts. Si l'espectre d'antagonisme és ampli, l'antagonista serà més semblant als productes químics (Powell 1993) i, per tant, tindria més acceptació i demanda en la seva comercialització. Realment, l'espectre d'antagonisme tan estret dels ACBs que hi ha disponibles comercialment és molt específic d'un patògen i d'un tipus de cultiu, essent aquest un dels punts més criticats enfront als productes de síntesi, que tenen generalment un espectre d'acció més ampli (Alabouvette i Lemanceau 1999). Que un ACB inhibeixi molts microorganismes diferents pot ser degut a que produeixi un sol metabòlit amb un ampli espectre d'inhibició o bé que produeixi diferents metabòlits que poden interaccionar amb diferents patògens. Hi ha metabòlits que són importants en les interaccions entre bacteris i fongs com les quitinases (Frändberg i Schnürer 1998), entre bacteris com les bacteriocines (Vanneste i col. 1992), o en ambdós casos com el Phl (Keel i col. 1996, Cronin i col. 1997). Si, a més, en el cas d'alguna soca l'antagonisme és independent del medi assajat, indicarà que l'assoliment d'aquest antagonisme serà més probable també en condicions variables com són les dels ambients naturals on es vol aplicar. Tant un ampli espectre d'antagonisme com la independència del medi, són aspectes desitjables en un ACB perquè poden afavorir la colonització d'un hàbitat per l'èxit en la competició enfront altres microorganismes (Dowling i O'Gara 1994).

Quant a l'espectre d'antagonisme en les soques estudiades en el nostre treball, es van obtenir 30 soques (41.7 %) antagonistes dels 5 patògens en algun medi. D'aquestes 30 soques, 22 produeixen Phl i HCN, una PCA, Prn i quitinases, una altra IAA, i 5 no produeixen cap metabòlit dels determinats (a excepció dels sideròfors, que és un tret comú de totes les soques). Respecte a la dependència del medi en que s'expressa aquest antagonisme, hi ha soques que mantenen el seu antagonisme en tots els medis i altres solament en alguns. En el cas de les 20 soques que mostren antagonisme en tots els medis enfront algun dels tres bacteris patògens, totes produeixen Phl i HCN o PCA a excepció de 2 (EPS383 i EPS384), que no produeixen cap dels metabòlits determinats. Enfront els 2 fongs patògens, totes les 28 soques que mostren antagonisme contra algun d'ells en tots els medis assajats produeixen HCN i Phl, a excepció de 5. De les 5 restants, 1 produeix quitinases, una altra HCN, i 3 cap dels productes determinats (EPS372, EPS375 i EPS383). Que mostrin ampli espectre (3 o 4 patògens alhora) independentment del medi, hi ha 7 soques, quatre d'elles productores de Phl i HCN, una de Phl, i 2 de cap metabòlit (EPS372 i EPS383). Cal tenir en compte que la soca EPS372 és patògena de plantes (HR⁺) i, per tant, l'antagonisme observat pot venir donat per la síntesi de toxines. Els nostres resultats concorden amb els descrits per altres autors quant a que el floroglucinol és actiu envers els fongs i els bacteris (Keel i col. 1996), ja que la majoria de soques productores de Phl han mostrat ser antagonistes tant en fongs com en bacteris.

Pel que fa referència al nombre d'antagonistes enfront els bacteris patògens assajats, s'han obtingut més antagonistes contra *E. amylovora* i en medi KB. Aquest alt nombre d'antagonistes podria ser degut a la competició que s'estableix pel ferro en KB, i a l'eficiència dels sideròfors de les soques antagonistes per captar el ferro ja que en suplementar els medis amb ferro s'observa una disminució considerable en el nombre d'antagonistes. Contràriament, quan el patogen indicador és *P. syringae*, la diferència entre el nombre d'antagonistes en medi KB i KB suplementat amb ferro és mínima. Possiblement es deu a que en aquest cas la competència pel ferro és més igualada per la producció de sideròfors tant del patogen com de l'antagonista amb una afinitat pel ferro similar.

Quant a la intervenció de les quitinases en l'antagonisme envers els fongs, de les 6 soques que produeixen quitinases, n'hi ha 3 que són antagonistes dels dos fongs en quasi tots els medis (CHA0, BL915 i EPS263). Aquestes tres soques produeixen quitinases i pirrolnitrina i, a més, una produeix HCN i Phi (CHA0) i l'altra PCA (EPS263). De les altres 3 soques productores de quitinases, l'EPS340 solament va mostrar antagonisme contra *Penicillium expansum* i les dues restants (EPS550 i EPS424) envers *Stemphylium vesicarium*. En la major part de treballs s'ha vist que la producció de quitinases afecta visiblement el creixement dels fongs (Chernin i col. 1995, Zhang i Yuen 2000), però en algun cas l'activitat quitinolítica no afecta de manera visible al fong; per exemple, les hifes de *P. roqueforti* poden envair la colònia bacteriana sense veure's afectades per les quitinases produïdes per *Flavobacterium* K39 (Fränberg i Schnürer 1998).

Els resultats obtinguts en el nostre treball també posen de manifest que malgrat que hi ha soques que tenen en comú la producció del mateix metabòlit, aquestes es comporten diferentment respecte a l'espectre d'antagonisme. Per exemple en el cas de les soques productores de PCA EPS894, EPS895 i 2-79. Les soques EPS894 i EPS895 no són antagonistes *in vitro* dels fongs i, en canvi, si ho són d'alguns dels bacteris com *E. amylovora*, mentre que la soca 2-79, és antagonista *in vitro* de *P. expansum* i, entre els bacteris, no és gaire efectiva enfront *E. amylovora*. Aquestes observacions semblen conduir a la consideració de que, a part del metabòlit PCA, hi ha altres factors desconeguts que afecten la capacitat d'inhibició del patogen en els assaigs *in vitro*.

En els assaigs de biocontrol d'infeccions, hi ha diferents factors que han demostrat ser importants en els nostres resultats. Alguns d'ells es poden controlar fàcilment en els assaigs al laboratori, com són les concentracions dels ACBs i del patogen (Raaijmakers i col. 1995, Montesinos i Bonaterra 1996); altres, però, no són tan fàcils de controlar, com la susceptibilitat del material vegetal emprat (estat fenològic de l'hoste) (Bonaterra 1997). Finalment, cal tenir en compte aquells factors que poden ser tan dependents de la soca emprada que són difícilment controlats quan en l'assaig

intervenien un gran nombre de soques com pot ser l'expressió d'alguns trets inhibits o estimulats per algun component del medi de cultiu on s'ha preparat l'inòcul.

S'observa que succeeix el mateix que en l'antagonisme *in vitro* en el sentit de que hi ha més soques biocontroladores d'*E.amylovora* que no de fongs. En els bioassaigs d'aquest patogen, de les 15 soques que exerceixen una eficàcia de biocontrol igual o superior al 75 %, n'hi ha 10 que produeixen diferents metabòlits (Phl, HCN, PCA, Prn, IAA o quitinases) i 5 que no produeixen cap dels productes. En algunes d'aquestes 5 soques (EPS818, EPS372) s'observa una excel·lent relació entre els resultats obtinguts *in vitro* (halos d'inhibició amb independència del medi), però en altres la relació és baixa (EPS340, EPS378).

Pel que fa referència a la inhibició de les podridures causades per *P. expansum*, de les 7 soques amb una eficàcia de biocontrol igual o superior al 75 %, 3 són productores de PCA, 1 de Prn, 1 de quitinases i, finalment, 3 no produeixen cap dels metabòlits determinats. Si es comparen els resultats *in vitro* i *in vivo*, 4 de les 7 soques no van mostrar antagonisme *in vitro* en cap dels medis assajats mentre que BL915 si ho era en tots els medis.

El mateix succeeix en el cas de la inhibició d'infeccions per *S. vesicarium*, ja que de les 7 soques amb eficàcia superior o igual al 75 %, 4 no són productores de cap metabòlit dels detectats i les 3 restants són productores de Prn, Phl, HCN i PCA.

Potser el més rellevant dels resultats és el fet de que hi ha soques que es mostren eficients alhora en 2 o 3 dels bioassaigs realitzats. El més destacable és el cas de *P. fluorescens* 2-79 que és efectiva en tots tres. Aquesta soca, productora de PCA, no es va mostrar en canvi antagonista *in vitro* enfront *S. vesicarium* i *P. expansum* i solament en la meitat dels medis enfront *E. amylovora*. En altres casos s'han descrit aquestes relacions a l'inrevés, per exemple, la producció de pirrolnitrina per *Enterobacter agglomerans* IC1270 és poc important en el biocontrol en condicions d'hivernacle i, contràriament, és molt activa *in vitro* (Chernin i col. 1995, 1997).

Aquests resultats dels bioassaigs *in vivo* en el sentit de que les millors soques no són precisament les que presenten un ampli espectre d'antagonisme *in vitro* concorden amb els obtinguts per altres autors (Wei i col. 1991, 1996, Leeman i col. 1996, Ellis i col. 2000, Landa i col. 2001). En el cas de Wei i col. (1991, 1996) i Leeman i col. (1996), els autors apunten que, en el seu cas, el biocontrol s'assoleix gràcies a la inducció de la resistència sistèmica adquirida i, per postular aquesta hipòtesi, van inocular els ACBs a llocs diferents dels d'inoculació del patogen per poder descartar l'antibiosi i la competició en no existir un contacte directe entre ells.

El nostre estudi no permet establir tampoc cap relació entre les soques productores de quitinases i l'eficàcia del biocontrol, ja que dues de les soques productores (BL915 i CHA0) que biocontrolen

P. expansum, són també productores d'altres metabòlits. Aquesta implicació de les quitinases en el biocontrol de fongs ha estat ben establerta en una soca d'*E. coli* que expressant el gen de quitinases es capaç de controlar la malaltia provocada per *R. solani* en cotó suprimint el creixement del fong i la producció d'espores (Chernin i col. 1997).

És interessant que algunes de les soques actives en biocontrol no produeixin cap dels metabòlits analitzats en el nostre treball. Cal tenir en compte que això no implica que no puguin produir-ne d'altres com per exemple la viscosinamida, produïda per membres de *Pseudomonas* i que mostra també propietats antibiòtiques. Aquest fet obre un camp en la línia de recerca, per estudiar la possible producció de nous metabòlits que puguin estar implicats en la seva capacitat de biocontrol. Pot succeir també que el biocontrol assolit fos degut a altres mecanismes diferents a la producció de metabòlits amb propietats antifúngiques i antibacterianes com seria el cas de la inducció de la resistència sistèmica adquirida (si per exemple, la soca fos productora d'àcid salicílic, que provoqués les respostes que acompanyen a la resistència sistèmica adquirida) o bé per competició pels nutrients o per l'hàbitat. Diversos treballs han emprat, per a l'estudi de la competició, l'anomenat índex de solapament de nutrients. Majoritàriament sol emprar-se el sistema Biolog per determinar el ventall de substrats que comparteixen l'ACB i el patogen (Bonaterra 1997, Ellis i col. 2000, McSpadden i col. 2000). El principal problema en la comparació dels perfils metabòlics amb el Biolog és que, malgrat que mostra la utilització d'un determinat substrat, no dona informació sobre l'eficiència del microorganisme en la seva utilització, que és molt important en la competició per nutrients donat que les concentracions en els ambients naturals és molt petita. Cal també pensar que en el Biolog hi ha fonts de carboni que possiblement no són les que es troben a camp i, per tant, seria més útil disposar d'un sistema en que els substrats fossin els disponibles en el sòl o en la planta (Grimont i col. 1996, McSpadden i col. 2000).

Les soques de referència utilitzades han mostrat que, tot i que no són eficaces en tots els assaigs de biocontrol, sí que ho són en alguns d'ells. De fet, solament s'havien escollit com a soques de referència externes i no se sabia en principi el seu comportament vers els patògens assajats. Hi ha molts casos en que bons ACBs de determinats patògens i en sistemes concrets, no ho són en canviar de patosistema (Smith i Goodman 1999).

A un altre nivell, la caracterització fenotípica de les soques seleccionades en el nostre treball ha inclòs l'estudi de l'efecte estimulador/inhibidor del creixement vegetal. S'ha definit l'acció promotora del creixement de les plantes en dues vessants: quan el bacteri actua directament sobre el creixement de la planta amb la producció d'hormones o millorant la disponibilitat de nutrients, o quan l'acció és indirecta a causa de l'eliminació de patògens per qualsevol mecanisme (antibiosi, competició per l'hàbitat, etc). Però Bashan i Holguin (1998) proposen que la definició correcta de bacteri promotor de creixement s'hauria d'aplicar solament als bacteris que actuen per qualsevol mecanisme diferent a la supressió d'altres microorganismes (producció d'hormones, ajudant a

l'establiment de micorrizes , etc.). En el nostre treball, degut al fet que hem utilitzat substrat no estèril, hem entès la promoció del creixement sense la distinció entre els mecanismes mitjançant els quals s'assoleix la promoció, tenint però en compte, que no s'ha inoculat cap patògen. Sense la inoculació de patògens semblaria que realment es tingués en compte la promoció de creixement definida per Bashan i Holguin (1998). Malgrat no inocular patògen poden haver els anomenats microorganismes danyins (DBR, deleterious rhizosphere bacteria /bacteris de la rizosfera perjudicials) (Berggren i col. 2001). S'ha de tenir en compte, però, que els assaigs en sòl no estèril no posen de manifest l'aptitud de control biològic contra patògens i moltes vegades els aspectes positius no són evidents si les plantes no es troben en condicions de camp normals on hi ha patògens (Eneback i col. 1998).

Entre els bacteris del grup de *Pseudomonas* capaços de promoure el creixement de les plantes, s'han citat diversos mecanismes com la millora de la nutrició mineral, la supressió de malalties o la producció de fitohormones (Timmusk i col. 1999). S'ha demostrat també la importància de l'efectivitat de la colonització de la rizosfera i el nombre de bacteris que es poden establir en el sistema (Kloepper i col. 1993). L'estudi de l'efecte beneficiós de l'aplicació de bacteris com a BPCP s'ha realitzat molt extensament en plantes herbàcies (Kloepper 1992) però hi ha pocs treballs on s'hagi portat a terme en llenyoses i, entre aquests, molt pocs en fruiters. En un d'aquests treballs, realitzat per Caesar i Burr (1987) en portaempelts de pomera, es van identificar soques de *Pseudomonas* que estimulaven el creixement dels portaempelts .

De manera semblant al que succeeix en els estudis anteriors de biocontrol, hi ha molts factors que han demostrat ser importants en els assaigs s'activitat de promoció de creixement. L'alta especificitat entre el portaempelts i la soca inoculada que hem observat en el nostre treball ha estat descrita també per altres autors (Smith i Goodman 1999). Un dels factors que té importància en l'efecte de l'aplicació dels BPCPs és el medi de cultiu i el tipus de cultiu emprats pel creixement de la soca de cara a la preparació de l'inòcul. La consistència del medi (líquid o sòlid) i les diferents composicions han demostrat ser importants i, a més, a vegades són específiques de la soca, malgrat que no es pot generalitzar. Borowicz i col. (2000) van demostrar en els seus assaigs en cogombre que el resultat obtingut amb la mateixa soca era inhibidor o promotor del creixement depenent del tipus de medi emprat. Aquests resultats van conduir a la conclusió de que és millor el creixement de la soca en medi líquid que no en medi sòlid. Caesar i Burr (1987) també van obtenir un resultat diferent amb l'ús d'una soca marcada amb resistència a un antibiòtic enfront la soca salvatge. Els autors citen la possible implicació de mutacions en el cultiu, donat que la inoculació de la soca salvatge s'havia realitzat a partir d'una sola colònia aïllada de la placa i la de la soca marcada amb resistència a antibiòtics s'havia fet a partir d'una barreja d'una vintena de colònies.

L'aspecte més rellevant dels nostres resultats és l'alt nombre de soques que actuen com a promotores del creixement en el portaempelts de prunera Marianna 2624 enfront al nombre en l'híbrid de presseguer i ametller GF677. A més de la quantitat, és remarcable també que l'índex de

creixement assolit en els dos portaempelts, entès com la relació entre el creixement amb els portaempelts inoculats respecte als controls, és molt diferent. En Marianna 2624 hi ha 6 soques que han mostrat índexs de promoció del creixement iguals o superiors a 2,5, mentre que cap de les soques sobrepassa un índex de 1,8 en GF677. Aquests resultats són semblants als obtinguts per Eneback i col. (1998) que varen treballar amb dues espècies diferents de pins i aplicaven els BPCPs a les llavors, demostrant també que els efectes són específics de la soca i de l'espècie de pi.

Entre els metabòlits que s'han descrit en l'acció promotora del creixement, sembla clar que l'àcid-3-indolacètic (IAA) actua com a mitjancer en l'efecte inhibitor o promotor del creixement (Gutierrez-Mañero i col. 1996). En aquest sentit, Barazani i Friedman (1999) van demostrar que els bacteris que produïen grans quantitats d'IAA provocaven un efecte inhibitor del creixement i que, contràriament, els bacteris que van promoure el creixement alliberaven solament petites quantitats d'IAA. En el nostre treball, la detecció de la producció d'IAA ha estat solament qualitativa i, de les 4 soques productores, 3 (CHA0, EPS381 i EPS600) van mostrar un índex superior a 2 en Mariana 2624 i igual o menor que 1 en GF677. Els índexs obtinguts amb l'altra soca productora d'IAA (EPS230) van ser de 1.2 i 0.7, respectivament. Benizri i col. (1998) van demostrar que els exsudats de les arrels influeixen en la quantitat d'IAA produït per una determinada soca; per tant, la conversió per part dels microorganismes dels exsudats de la planta en IAA pot ser molt diferent en medis sintètics, sobretot els que incorporen L-triptòfan que n'és un precursor. Això implica que per conèixer si és produït IAA i la quantitat produïda s'hauria de realitzar l'assaig de detecció emprant com a medi de cultiu els exsudats de la planta. Tot i que cap autor qüestiona el paper de l'IAA en la promoció del creixement, Shah i col. (1998) proposen que l'estimulació del creixement es realitza indirectament per l'activitat de l'enzim 1-aminociclopropà-1-carboxilat desaminasa del bacteri, que provoca una disminució dels nivells d'etilè en la planta provocant un augment de la grandària de les arrels. Segons aquests autors, l'IAA sintetitzat pel BPCP s'adheriria a la superfície de l'arrel de la planta, seria internalitzat i, juntament amb l'IAA endogen, estimularia la proliferació o allargament de les cèl·lules o induiria l'activitat de l'enzim l'enzim 1-aminociclopropà-1-carboxilat sintasa. Al seu torn, la síntesi d'1-aminociclopropà-1-carboxilat (ACC) per la planta es veuria augmentada i una part molt significativa seria exsudada i metabolitzada pel bacteri. Com que l'ACC és l'immediat precursor de l'etilè en les plantes, la disminució del nivell d'etilè que inhibeix el creixement de l'arrel es traduiria en un desenvolupament superior.

Un altre dels metabòlits implicats en la promoció del creixement és el HCN (Gutierrez-Mañero i col. 1996). La majoria de vegades el HCN actua com inhibitor del creixement i segons Wei i col. (1991) aquest fet és molt accentuat quan l'assaig es porta a terme en condicions estèrils, però no és tan observable en condicions no estèrils. En el nostre treball, 3 de les 4 soques que mostren més efecte inhibitor (índexs entre 0.3-0.6) en Marianna 2624 són productores de HCN, tot i que també hi ha una soca productora de HCN i Phl en una de les promotores de creixement (Q₂₋₈₇).

Capítol 4: **Caracterització genotípica**

4.1 Introducció

L'anàlisi de les característiques fenotípiques i genotípiques d'un grup de microorganismes seleccionats en base a la seva capacitat d'inhibir *in vitro* i *in vivo* bacteris i fongs fitopatògens, pot ajudar a aprofundir i esbrinar si existeixen marcadors moleculars associats. Aquests podrien ser la base per a la utilització de mètodes alternatius als emprats actualment en la selecció d'agents de biocontrol. A més, la caracterització genotípica és important tant pel seguiment i identificació dels microorganismes com per la protecció legal de patents que impliquin els ACBs ja que possibilita la determinació precisa de seva identitat (Berg i col. 2000). En els darrers anys l'avenç en les mètodes moleculars basades en els àcids nucleics ha permès un ràpid desenvolupament de tècniques que permeten estudis genòmics en molts microorganismes. Malgrat això, s'han portat a terme pocs estudis a nivell genòmic en grups d'ACBs, i sobre tot d'anàlisis comparatives de soques actives i no actives en biocontrol. La major part dels esforços en aquest sentit han tingut lloc amb soques productores de l'antibiòtic floroglucinol (Keel i col. 1996, Zala i col. 1997, Sharifi-Tehrani i col. 1998, Picard i col. 2000, McSpadden 2000, 2001, Mavrodi i col. 2001).

En el present treball s'han escollit dos mètodes de caracterització molecular: (1) l'anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR del DNA que codifica per l'RNA 16S ribosomal (16S rDNA) juntament amb el DNA de l'espai intergènic entre el 16S i el 23S rDNA (RFLP-PCR-rDNA); i (2), l'anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de macrorestricció genòmica generats amb l'ús d'enzims de restricció de tall poc freqüent i separats amb electroforesi en camp polsant (MRFLP-PFGE). En el primer cas, la caracterització genòmica es realitza en una part molt concreta del genoma bacterià i en el segon sobre la totalitat del genoma.

4.1.1 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR del 16S rDNA i de l'espai intergènic entre el 16S i 23S rDNA (RFLP-PCR- rDNA)

Les seqüències del 16S rDNA són altament conservades entre els eubacteris (Woese 1987), i per tant, l'anàlisi de les variacions en les seqüències en aquesta regió no ha mostrat ser una eina apropiada per a la realització d'estudis a nivell intraespecífic (Laguerre i col. 1996). En contraposició, l'anàlisi de l'espai intergènic entre les seqüències del 16S i 23S rDNA (ITS o IGS, espai intern transcrit) sí que ha permès estudiar les variacions a nivell intraespecífic a l'obtenir-se una variabilitat més elevada (Barry i col. 1991). Varis autors consideren aquests mètodes com un anàlisi de patrons de restricció de DNA ribosomal amplificat (ARDRA) modificat degut a la seva estreta relació amb els gens ribosomals (Nastch i col. 1997, Khbaya i col. 1998, Sharifi-Tehrani i col. 1998).

Malgrat que la mida dels ITS sol ser més curta que la dels gens *rrs* (16S rDNA) i *rrl* (23S rDNA), (per exemple en *Pseudomonas syringae*, l'ITS conté 550 pb enfront les 1600 i 2300 pb del 16S i 23S rDNA), s'han arribat a establir relacions entre les agrupacions definides per aquesta tècnica i diferents biovars en algunes espècies de bacteris fitopatògens i simbionts. En el cas de *P. syringae* la resolució dels RFLP-ITS assolix el nivell d'agrupació de patovars i genomoespècies (Manceau i Horvais 1997) i en *Bradyrhizobium* el nivell de resolució es superior al de la utilització de la tècnica ARDRA (Doignon-Bourcier i col. 2000). Malauradament, també hi ha estudis en els que les agrupacions obtingudes no es relacionen amb característiques dels biovars, com per exemple en *Rhizobium leguminosarum* (Laguerre i col. 1996).

Com ja s'ha comentat en la introducció general d'aquesta memòria, també s'han realitzat estudis d'RFLP emprant els amplificats que corresponen al 16SrDNA i l'ITS. Un dels treballs realitzats amb l'anàlisi RFLP del 16S rDNA i l'ITS en *Agrobacterium* va permetre la separació dels diferents biovars descrits dins l'espècie (Ponsonnet i Nesme 1994).

En el cas de *Pseudomonas*, Laguerre i col. (1994) van detectar mitjançant anàlisi ARDRA variacions intraespecífiques en *Pseudomonas fluorescens* i *P. putida* emprant poques soques. Per aquest motiu, és d'esperar que amb la utilització d'un nombre superior de soques i procedents de mostres naturals molt diverses, aquestes variacions encara siguin més remarcades. Si a més, s'empra l'amplificació conjunta del 16S rDNA i l'ITS, els polimorfismes que es puguin detectar encara seran més nombrosos degut a la variabilitat del propi ITS.

4.1.2 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de macrorestricció genòmica generats amb l'ús d'enzims de restricció de tall poc freqüent i separats amb l'electroforesi en camp polsant (MRFLP-PFGE)

Les anàlisis genètiques que permeten distingir soques dins d'una mateixa espècie, tot i que estiguin relacionades genèticament, són eines molt útils per a la seva caracterització individual. Disposar d'una tècnica que permeti aquest nivell d'identificació es avantatjós per a dur a terme estudis relacionats amb el biocontrol. En el cas de tenir un conjunt de soques amb les mateixes característiques fenotípiques, la tècnica permet separar aquelles que són genèticament idèntiques i que per tant es raonable assumir que es comportaran igual. D'aquesta manera es pot fer una reducció del nombre de soques amb les que s'ha de realitzar l'estudi. Altres avantatges rauen en que és possible confirmar la identitat de les soques un cop recuperades després de la inoculació o d'un tractament realitzat i, cada vegada més, esdevé una caracterització de les soques que s'utilitza per fonamentar la sol·licitud de patents.

A la taula 4.1 es presenta un recull de les característiques més destacades pel que fa referència a la rapidesa, economia i reproducció de les tècniques emprades per a la determinació d'empremtes de DNA i altres aspectes relacionats.

Taula 4.1. Avantatges i inconvenients de les tècniques per a la determinació d'empremtes de DNA. RAP, polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats per PCR amb encebadors arbitraris; REP, polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats per PCR amb encebadors de DNA repetitiu de seqüències altament conservades; AFLP, polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats per PCR selectivament a partir de fragments de restricció genòmica; PFGE, electroforesi de camp polsant de macrofragments de restricció.

Table 4.1. Advantages and disadvantages of different fingerprinting methods. RAP, Random amplified polymorphism; REP, length polymorphism amplified fragments using primers complementary to repetitive highly conserved DNA sequences; AFLP, amplified length polymorphism; PFGE, pulsed field gel electrophoresis of macrorestriction fragments.

Característica	RAP	REP	AFLP	PFGE
Rapidesa	***	**	*	*
Economia	***	***	**	**
Reproducció	*	***	***	***
Perill de contaminacions	***	**	**	*
Interpretació dels resultats	*	**	***	*
Discriminatori	**	***	***	***

* El nombre d'asteriscs indiquen una puntuació positiva elevada

* Asterisc number is indicative of positive punctuation

Evidentment, les metodologies que es basen en la PCR per a amplificar el DNA són les més econòmiques. En el cas dels AFLP al ser una metodologia amb diferents estratègies (restriccions, lligacions, amplificacions) el cost és més comparable al de la PFGE, tot i que els AFLPs són de difícil interpretació. Quant al perill de contaminacions també són les metodologies basades en la PCR, les més susceptibles a les contaminacions precisament degut al seu poder d'amplificació, de manera que contaminacions per petites quantitats d'amplicons poden interferir en el resultat.

En el camp del biocontrol, durant els darrers 5 anys, a rel de l'interès suscitat per les soques productores de floroglucinol, s'han portat a terme treballs que empen un ampli ventall de tècniques moleculars basades en el DNA (ARDRA, RAP, ERIC, BOX, REP) en aquest grup de soques (Sharifi-Tehrani i col. 1998, Mavrodi i col. 2001, McSapadden i col. 2000, 2001, Picard i col. 2000)

4.1.3 Objectius

L'objectiu d'aquest capítol ha estat la caracterització genotípica d'un conjunt de soques del grup fluorescent de *Pseudomonas* possibles agents de biocontrol. Els objectius concrets han estat:

1- Realitzar l'anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR de DNA del gen 16S rDNA juntament amb l'espai intergènic entre el 16S i el 23S rDNA (RFLP-PCR- rDNA), i dels polimorfismes en la longitud dels fragments de macrorestricció de tot el genoma generats amb l'ús d'enzims de restricció de tall poc freqüent i posterior separació amb electroforesi de camp polsant (MRFLPs-PFGE), en un conjunt de soques de *P. fluorescens*.

2- Caracteritzar un grup de soques productores de floroglucinol mitjançant RFLP-PCR-rDNA i MRFLP-PFGE, així com per l'anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR del gen *phlD* (RFLP-PCR-*phlD*) i seqüenciació d'aquest mateix gen.

4.2. Material i Mètodes

4.2.1 Soques utilitzades

S'han estudiat les mateixes 72 soques bacterianes caracteritzades fenotípicament en el Capítol 3. De les 72, 70 pertanyen a l'espècie *P. fluorescens* i 2 a *P. putida*. Els medis de cultiu han estat LB, KB, MM1 i MM2 (descrits en l'annex 2 i 4), i els tampons i referències dels aparells es citen en l'annex 4. Totes les soques es van conservar en tubs amb caldo LB suplementat amb glicerol al 20 % i a -70 °C. A fi d'evitar canvis durant l'estudi es van preparar varis tubs de conservació procedents del mateix cultiu original, de manera que cada vegada s'agafava un nou tub.

4.2.2 Caracterització genotípica

La caracterització genotípica es va realitzar amb l'anàlisi dels polimorfismes dels patrons dels fragments de restricció del DNA amplificat corresponent al 16S rDNA i l'espai intergènic (ITS) i amb l'anàlisi dels polimorfismes dels patrons de macrorestricció del genoma bacterià separats amb electroforesi en camp polsant (PFGE) (Figura 4.1).

Es va realitzar també una caracterització genotípica més àmplia d'un grup de soques portadores dels gens biosintètics implicats en la síntesi de l'antibiòtic floroglucinol. En aquest grup de soques es va efectuar a més de les anàlisis citades al paràgraf anterior, una anàlisi dels patrons de restricció dels amplificats per PCR (RFLP-PCR-*phlD*) i la seqüenciació del gen *phlD*.

4.2.2.1 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR del 16S rDNA i de l'espai intergènic entre el 16S i 23S rDNA (RFLP-PCR-rDNA)

a) Obtenció del DNA

A partir de cultius de 48 h de les soques bacterianes sembrades en plaques de LB, es va procedir a la preparació de la mostra utilitzant una modificació del protocol emprat per Keel i col. (1996).

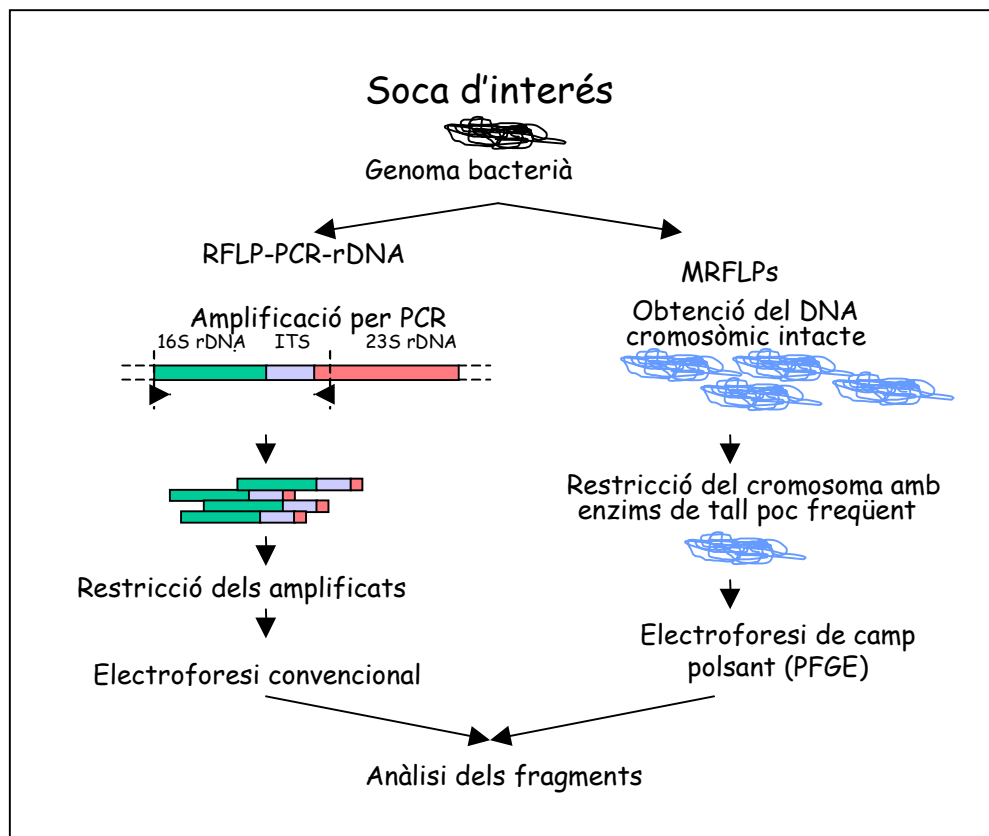


Figura 4.1 Esquema dels mètodes emprats en la caracterització genotípica de les soques.
Figure 4.1 Methods used for genotypic characterization of strains.

Es va procedir de la següent manera:

- 1- Es transfereix una colònia aïllada de la soca en brou KB i s'incuba per un període de 24 h a 25 °C.
- 2- Es transfereixen 10 µL del cultiu a un microtub que conté 90 µL de tampó de lisi (rDNA)
- 3- S'incuba el microtub a 99 °C durant 10 min. La mostra està preparada per ser utilitzada directament o guardada a -20 °C fins al moment del seu ús.

En algun cas va ser necessària l'extracció de DNA d'una qualitat superior, realitzant-se una extracció del DNA bacterià amb el sistema WIZARD® Genomic DNA Purification Kit (Promega). L'extracció de DNA es va portar a terme amb el protocol següent:

- 1- Es parteix d'un mL de cultiu de nit en medi LB que es diposita en un microtub de 1.5 mL i se centrifuga durant 2 min a 13000 g, descartant el sobrenedant.
- 2- S'afegeixen 600 µL de la solució de lisi del Kit i es resuspèn el sediment amb l'ajut d'una pipeta automàtica. S'incuba 5 min en un bany a 85 °C i es deixa refredar a temperatura ambient.
- 3- S'afegeixen 3 µL de solució RNAsa al lisat cel·lular i es barreja per inversió del tub unes 25 vegades. S'incuba durant 40 min a 37 °C i es deixa refredar a temperatura ambient.
- 4- S'afegeixen 200 µL de la solució de precipitació de proteïnes al lisat tractat amb RNAsa i es barreja vigorosament amb l'ajut del vòrtex a velocitat alta durant 20 s.
- 5- S'incuba en gel durant 5 min i se centrifuga durant 3 min a 13000 g.
- 6- Es transfereix el sobrenedant (on es troba el DNA) a un nou microtub que conté 600 µL d'isopropanol a temperatura ambient barrejant suaument mitjançant la inversió del microtub.

- 7- Se centrifuga durant 2 min a 13000 g, es descarta el sobrenedant i es deixa assecar el microtub damunt d'un paper absorbent.
- 8- S'afegeixen 600 µL d'etanol al 70 % a temperatura ambient i s'inverteix el microtub per rentar el sediment.
- 9- Se centrifuga durant 2 min a 13000 g, i es descarta l'etanol, deixant assecar el sediment durant uns 10-15 min.
- 10- S'afegeixen 100 µL de solució de rehidratació de DNA i s'incuba a 65 °C durant 1 h. De tant en tant es barreja el contingut del tub.

El DNA extret es pot utilitzar o guardar a -20 °C fins el seu ús.

b) Amplificació del gen 16S rDNA i de l'espai intergènic entre el 16S-23S rDNA

b₁) Encebadors

Els encebadors emprats per a l'amplificació van ser els descrits per Normand i col. (1992) i Navarro i col. (1992) que es mostren a la taula 4.2. A la figura 4.2 es mostra un esquema dels llocs d'anellament dels encebadors en l'operó ribosomal.

Taula 4. 2 Encebadors emprats per l'amplificació per PCR.
Table 4. 2 Primers used for PCR amplification.

Encebador	Seqüència 5' → 3'	Referència
PGPS6	GGAGAGTTAGATCTTGGCTCA	Normand i col. 1992
FGPL132'	CCGGGTTTCCCCATTCGG	Normand i col. 1992
FGPS1490	TGCGGCTGGATCACCTCCTT	Navarro i col. 1992

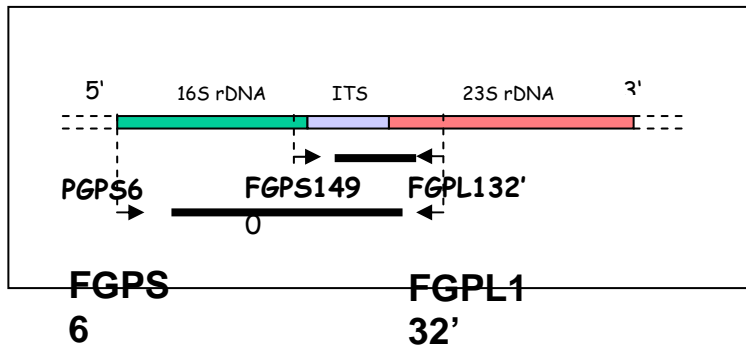


Figura 4.2 Posició dels encebadors emprats per l'amplificació per PCR dels gens ribosomals.
Figure 4.2 Primers position for the ribosomal gene amplification.

b₂) Amplificació

Es va portar a terme com s'indica en l'apartat 2.2.3.2 (Capítol 2) en un volum final de 50 µL per reacció, contenint:

Component	$\mu\text{L}/\text{tub de reacció}$
H ₂ O Milli-Q estèril	30.5
Tampó (10x)	5
MgCl (25mM)	6
dNTPs	2.5
Encebador 1 (10 μM)	0.5
Encebador 2 (10 μM)	0.5
Taq (3.5 U/ μL)	0.5
Mostra	5

Es va emprar Taq polimerasa High Fidelity (Roche Diagnostics) i un termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 de Perkin-Elmer. Els programes d'amplificació amb la utilització dels dos parells d'encebadors va ser la següent:

Cicles	T (°C)	(FGPS6 i FGPL132')	(FGPS1490 i FGPL132')
1	93	5 min	5 min
30	93	1 min	1 min
	55	1 min	40 s
	72	2 min 30 s	1 min
1	72	10 min	10 min
1	4	indefinidament	indefinidament

b₃) Electroforesi

Per a la separació dels amplificats es va procedir a la realització d'una electroforesi convencional descrita en l'apartat 2.2.3.2 (Capítol 2), carregant solament 8 dels 50 μL de la reacció. L'observació es va realitzar després de la tinció del gel amb bromur d'etidi.

c) Restricció dels fragments amplificats

Preliminarment, les restriccions dels fragments amplificats es van realitzar sense una neteja prèvia de la reacció comparant-les amb els resultats obtinguts després de netejar la banda amb dos protocols diferents.

Sense la realització de la neteja, es va emprar directament la mostra obtinguda de l'amplificació. Els dos protocols de neteja de l'amplificat consistien en: (i) la recuperació i neteja de l'amplificat a partir del retall del fragment d'un gel d'agarosa i posterior neteja amb l' Agarose Gel DNA extraction Kit (Roche Diagnostics) com s'ha descrit en l'apartat 2.2.4.2 (Capítol 2), i (ii) amb la utilització d'una columna de purificació d'amplificats amb el Concert[™] Rapid PCR Purification system Kit (Life Technologies).

Amb la utilització de la columna de purificació comercial es va procedir de la següent manera:

- 1 Abans de començar s'escalfa el tampó TE a 65 °C, mentre se comença el protocol afegint 400 µL de tampó d'unió (H1 del kit) a la reacció d'amplificació i es barreja.
- 2- Se situa una columna de purificació en l'interior d'un microtub de 2 mL de capacitat, es carrega la mostra en la columna i se centrifuga a 12000 g durant un min.
- 3- Es descarta el sobrenedant del microtub que ha actuat de recipient contenidor i s'afegeixen a la columna 700 µL de tampó de rentat (H2). Se centrifuga a 12000 g durant un min, es descarta el sobrenedant del microtub i es torna a repetir la centrifugació en les mateixes condicions.
- 4- Es posa la columna en un nou microtub de 1.5 mL, s'afegeixen 50 µL de tampó TE (preescalfat), s'incuba durant 1 min. a temperatura ambient i se centrifuga a 12000 g durant 2min.

Per a l'elecció dels enzims de restricció es van tenir en compte els resultats obtinguts per altres autors i es va realitzar una cerca al GenBank, de les seqüències disponibles dels 16S rDNA i ITS en membres de les espècies *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* i *P. putida* (Taula 4.3). Un cop obtingudes les seqüències es van introduir al programa Strider™ 1.1 i es van avaluar els enzims que s'havien escollit (*HaeIII*, *TaqI*, *RsaI* i *NdeI*). El nombre de talls i els fragments que es podrien resoldre en aquest treball es mostren en la taula 4.4 (superiors a 100 pb).

Taula 4.3 Seqüències de 16S rDNA i ITS extretes del GenBank corresponents a soques de *Pseudomonas*
Table 4.3 Sequences of 16S rDNA and ITS from *Pseudomonas* strains extracted from GenBank.

Espècie	16S rDNA		ITS	
	Soca	Accés al GenBank	Soca	Accés al GenBank
<i>P. fluorescens</i>	DSM50090T	Z76662	63-28	L06305
	PC18	AF228366	QP5	L06306
	PC24	AF228367	64-3	L06307
	A1(I)	U71003	R17FP ₂	L06304
	IAM12022	D84013	S-9	AF148208
	3.1	AF126101		
<i>P. aureofaciens</i>	IAM12353	D84008	nd	nd
<i>P. putida</i>	IH-2000	AB029257		
	GP0	AJ249825	nd	nd
	#HR9	AJ132993		
<i>P. chlororaphis</i>	LMG5004T	Z76657	nd	nd
	IAM12354	D84011		
<i>P. aeruginosa</i>	M2E	AF237683		
	H814	AB037563	nd	nd
	ATCC27853	AB037545		
	H707	AB037562		

nd: no disponible
 nd: not available

Taula 4.4 Anàlisi de restricció mitjançant el programa Strider™ 1.1. de les seqüències indicades a la taula 4.3 amb els enzims de restricció *HaeIII*, *TaqI*, *RsaI* i *NdeI*. Es mostren el nombre de dianes i fragments que es poden resoldre (mes grans de 100 pb).

Table 4.4 Restriction analysis performed with the Strider™ 1.1 program of the sequences listed in table 4.3 with the *HaeIII*, *TaqI*, *RsaI* i *NdeI* restriction enzymes. Number of target sequences and number of fragments obtained (more than 100 pb).

Espècie	Enzim	16S rDNA		ITS	
		Nº de dianes	Fragments resolts	Nº de dianes	Fragments resolts
<i>P. fluorescens</i>	<i>RsaI</i>	2 a 3	3 a 4	0	0
	<i>TaqI</i>	2 a 4	2 a 4	3 a 4	2 a 3
	<i>NdeI</i>	5 a 7	3	3 a 4	3
	<i>HaeIII</i>	7 a 8	4	0 a 1	0 a 2
<i>P. aureofaciens</i>	<i>RsaI</i>	4	4	-	-
	<i>TaqI</i>	2	2	-	-
	<i>NdeI</i>	6	3	-	-
	<i>HaeIII</i>	8	4	-	-
<i>P. putida</i>	<i>RsaI</i>	3 a 4	3 a 4	-	-
	<i>TaqI</i>	4 a 5	2 a 4	-	-
	<i>NdeI</i>	5 a 6	2 a 3	-	-
	<i>HaeIII</i>	7 a 8	4	-	-
<i>P. chlororaphis</i>	<i>RsaI</i>	3 a 4	4 a 5	-	-
	<i>TaqI</i>	2	3	-	-
	<i>NdeI</i>	2	3	-	-
	<i>HaeIII</i>	4	5	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	<i>RsaI</i>	4	5	-	-
	<i>TaqI</i>	4	3	-	-
	<i>NdeI</i>	9 a 10	4	-	-
	<i>HaeIII</i>	8	5	-	-

Per a la reacció de digestió, es preparava un microtub amb les quantitats detallades en la taula 4.5 assolint un volum total de 15 µL. En tots els casos es van incubar les digestions durant 3 h i es van guardar a -20 °C fins el moment de la realització de l'electroforesi.

Taula 4.5 Enzims de restricció emprats.

Table 4.5 Restriction enzymes used.

Enzim	Diana de tall	(U/µL)	Reacció de restricció (µL)				Temperatura d'incubació (°C)
			Tampó	H ₂ O	Enzim	Mostra	
<i>NdeI</i>	/GATC	5	9	-	1.5	7.5	37
<i>HaeIII</i>	GG/CC	10	1.5	2.7	0.8	10	37
<i>TaqI</i>	T/CGA	10	1.5	2.7	0.8	10	65
<i>RsaI</i>	GT/AC	10	1.5	2.7	0.8	10	37

f) Electroforesi

Es van provar dos agaroses diferents per determinar la resolució que s'obtenia en cada una d'elles. Aquestes van ser l'agarosa convencional a una concentració del 2.75 % i Nusieve 3:1 (FMC® Bioproducts) al 3 %.

Els gels van ser de 13x17 cm i les condicions d'electroforesi estàndard van ser de 3 h a 65 V. La metodologia de preparació, càrrega del gel, marcadors emprats, tinció i visualització dels resultats així com l'obtenció de les imatges i el càlcul de la mida dels fragments es va realitzar com en l'apartat 2.2.3 del Capítol 2.

g) Anàlisi dels resultats

Un cop obtingudes les mides dels fragments de restricció es va procedir a la conversió en valors binaris d'absència (0) o presència (1) de bandes en cada fragment definit. Aquesta matriu binària es va processar mitjançant el coeficient de Dice (S_D) per obtenir la matriu de similitud entre soques segons la fórmula següent (Sneath i Sokal 1973):

$$SD = \frac{2N_{xy}}{2N_{xy} + N_x + N_y}$$

sent

SD el coeficient de Dice

N_{xy} el nombre de bandes comuns entre les soques 1 i 2

N_x el nombre de bandes presents en la soca 1 i absents en la soca 2

N_y el nombre de bandes presents en la soca 2 i absents en la soca 1

Aquest coeficient reflecteix la proporció de caràcters comuns entre dues soques, si bé dóna doble valor als caràcters coincidents i, per tant, la coincidència té més pes que les diferències entre soques. El coeficient però, no valora el caràcter d'absència.

Per a l'obtenció de la matriu de similitud i la construcció de dendrograma pel mètode UPGMA (Unweighted Paired-Group Method using Arithmetic averages) va emprar-se el programa estadístic SPSS per Windows (versió 7.5.2S.SPSS. Ind. 1989-1997).

4.2.2.2 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de macrorestricció genòmica generats amb enzims de restricció de tall poc freqüent i separats amb electroforesi en camp polsant (MRFLP-PFGE)

En l'anàlisi dels fragments de macrorestricció emprant enzims de tall poc freqüent i posterior separació amb la tècnica de l'electroforesi de camp polsant, cal l'obtenció del DNA "intacte", és a dir, sense que per manipulacions mecàniques s'hagi trencat la molècula degut a la seva fragilitat. El protocol d'extracció del DNA comença amb la inclusió de les cèl·lules bacterianes en blocs d'agarosa. Al conjunt format per les cèl·lules bacterianes immobilitzades dins una matriu d'agarosa, rep en aquest treball el nom d' *insert*.

a) Preparació dels *inserts*

A partir d'un cultiu pur d'una soca bacteriana cultivada en agar LB, es procedeix de la següent manera:

- 1- Es transfereix una colònia aïllada a 6 mL de brou LB.
- 2- S'incuba a 22 °C amb agitació suau (100 rpm) unes 14 h aproximadament.
- 3- Es mesura l'absorbància a 620 nm per tal d'establir la concentració cel·lular. L' A_{620} d'1.2 correspon aproximadament a $2.5 \cdot 10^9$ ufc/mL.
- 4- Es dispensen 5 mL del cultiu en tubs de centrifuga prèviament esterilitzats i rentats amb etanol al 96 % i es centrifuga en fred (4 °C) a 14000 g durant 15 min.
- 5- Es desestima el sobrenedant i es resuspèn el sediment en 5 mL de tampó PET IV.
- 6- Es repeteix el procés de centrifugació i resuspensió del sediment en PET IV 3 vegades.
- 7- Es centrifuga per últim cop, es rebutja el sobrenedant i es resuspèn el sediment en el volum necessari de PET IV per assolir una concentració de $3.5 \cdot 10^9$ ufc /mL.
- 8- Es prepara el volum necessari d'agarosa de baix punt de fusió (InCert® Agarose. FMC® Bioproducts, Maine. U.S.A.) a l'1.6 % en tampó PET IV. Es pesa l'agarosa sense utilitzar espàtules de cap mena, sinó que es posa a pols. Es dissol l'agarosa escalfant la barreja al microones i es manté a 56 °C fins al seu ús.
- 9- Es barregen els mateixos volums de la suspensió bacteriana i de la dissolució d'agarosa, tenint en compte que per a cada *insert* cal un volum de 100-110 µL (50-55 µL de suspensió bacteriana i 50-55 µL de dissolució d'agarosa). La concentració final és de $1.75 \cdot 10^8$ ufc/*insert*.
- 10- S'homogeneïtza la barreja i es transfereix ràpidament als motlles (prèviament rentats amb etanol i havent posat una cinta adhesiva en la seva base).
- 11- Es deixa refredar a temperatura ambient (1-2 h) o a 4 °C (uns 30 min).

A partir de l'obtenció dels *inserts*, es van seguir dos protocols diferents per provocar la lisi cel·lular. El **protocol 1** descrit per a *Escherichia coli* (Smith i col. 1988) i que ha donat bons resultats en molts bacteris Gram negatius, i el **protocol 2** descrit per a membres del gènere *Pseudomonas* (Römling i Tümmler 1991). L'esquema general dels protocols de treball seguits es mostra a la figura 4.3

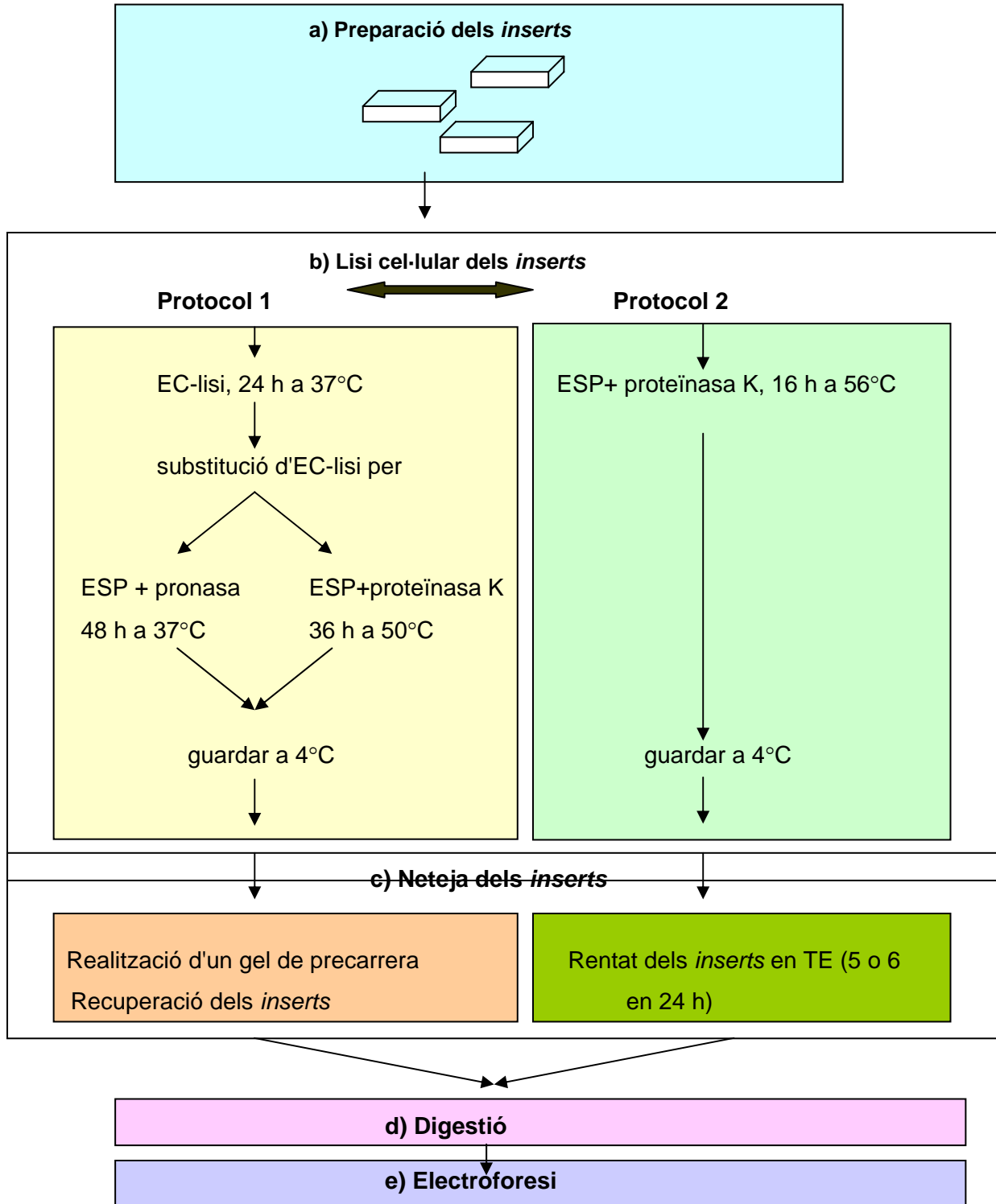


Figura 4.3 Representació esquemàtica dels protocols emprats per a l'obtenció dels fragments de macrorestricció genòmica. El protocol 1 i 2 de la lisi cel·lular corresponen als descrits per Smith i col. 1998 i Römbling i Tümmler 1991, respectivament.

Figure 4.3 Simplified flux diagramme of protocols used to obtain genomic macrorestriction fragments. Protocols 1 and 2 were described by Smith et al. 1998 and Römbling and Tümmler 1991 respectively.

b) Extracció del DNA. Lisi de les cèl·lules bacterianes immobilitzades en els *inserts*

Protocol 1

- 1- Es transfereixen els *inserts* d'agarosa solidificats en tubs que contenen la solució EC-lisi i se suplementa al moment amb 1 mg/mL de lisozim i 20 µg/mL de RNAsa (traient la cinta adhesiva que actua de base en els motlles i fent pressió en aquesta base amb l'ajut d'una pera de goma). La relació mL solució de lisi/*insert* ha de ser d'1.
- 2- S'incuba a 37 °C durant 24 h.
- 3- S'elimina la solució d'EC-lisi i s'afegeix la solució ESP amb pronasa o proteïnasa K (1mg/mL), mantenint la relació mL solució/*insert* igual a 1. L'avantatge de la utilització de la pronasa respecte a la proteïnasa K rau en la seva economia i en el fet de que la temperatura d'incubació de l'enzim és menor, suposant un tractament més suau per als blocs d'agarosa.
- 4- S'incuba 48 h a 37 °C en el cas de l'ESP+pronasa, i 36 h a 50 °C en el cas d'ESP i proteïnasa.
- 5- Si tot seguit no es realitza la neteja dels *inserts*, es poden emmagatzemar a 4 °C fins al seu ús.

Protocol 2

- 1- Es transfereixen els *inserts* d'agarosa solidificats a tubs que continguin la solució ESP+ proteïnasa K. La relació mL solució de lisi/*insert* ha de ser també d'1.
- 2- S'incuba a 56 °C d'un dia per l'altre (unes 15 h) i en les primeres h d'incubació s'agiten els tubs suaument.
- 3- Si tot seguit no es realitza la neteja dels *inserts*, es pot emmagatzemar a 4 °C fins al seu ús.

c) Neteja dels *inserts*

L'objectiu d'aquesta etapa és l'extracció de totes les restes cel·lulars així com de la proteïnasa K o la pronasa. És molt important una correcta neteja dels *inserts* perquè petites quantitats de proteïnasa K o pronasa podrien interferir amb els enzims de restricció utilitzats en la posterior digestió del DNA. Després de la lisi cel·lular amb els dos protocols, es van seguir dos mètodes diferents per al rentat dels *inserts*: un dels mètodes es basa en la realització d'una precarrera electroforètica, i l'altre consisteix amb el rentat dels *inserts* amb tampó. En aquest treball es va realitzar una precarrera electroforètica amb els *inserts* procedents del protocol 1 i la realització de rentats pels *inserts* procedents del protocol 2. Val a dir que ambdues metodologies en el rentat són vàlides, sigui quin sigui el protocol seguit de lisi cel·lular.

Neteja dels *inserts* procedents del protocol 1

Per a la neteja dels *inserts* es procedeix a la realització d'un gel de precarrera. Aquests gels serveixen per eliminar les restes cel·lulars i, al mateix temps, si les condicions de l'electroforesi ho permeten, posar de manifest l'existència del material extracromosòmic.

- 1- Es prepara un gel d'agarosa a l'1 % en tampó TBE 0.5x modificat (baix contingut amb EDTA)
 - 220 mL d'H₂O mQ (no cal estèril).
 - 2.2 g d'agarosa (Sea-Kem ® ME Agarose de RMC® Bioproducts).
 - 11 mL de tampó TBE 10x.
- 2- S'escalfa al microones fins a ebullició, comprovant que el volum final és de 220 mL en total. Es deixa refredar uns 20 min vigilant que no solidifiqui.
- 3- S'aboca en el motlle del gel d'electroforesi que prèviament ha estat netejat amb etanol i s'espera que solidifiqui. Amb antelació s'han unit diferents prolongacions de la pinta de manera que els pouets quedin molt grans en el sentit horitzontal (suficient per a 2 *inserts*).

- 4- Es recupera l'*insert* emmagatzemat a 4 °C, amb l'ajut d'una pipeta Pasteur i es diposita l'*insert* damunt la cara interior d'un tros de parafilm.
- 5- Amb l'ajut d'un cubreobjectes i una pipeta Pasteur, es col·loca l'*insert* a l'interior del pouet del gel, dipositant-lo en la part frontal i tocant a la base.
- 6- Es segella el pouet amb agarosa (Sea-Kem ® ME Agarose de RMC® Bioproducts, Maine. U.S.A.) al 0.5 % en tampó TBE 0.5x.

Condicions de la precarrera electroforètica: les condicions de la precarrera són polsos de 125 segons a 330 V durant 36 h. En aquestes condicions el DNA extracromosòmic circular de menys d'1 Mb i el DNA degradat penetren en el gel mentre que el DNA cromosòmic queda retingut en l'*insert*. Aquesta electroforesi preparativa es realitza amb el sistema OFAGE (Carle i Olson 1984). Els elèctrodes puntuals negatius es disposen en les cares Nord i Oest a 30, 120 i 210 mm del vèrtex Nord-Oest, mentre que els positius es col·loquen a les cares Sud i Est a 60 mm del vèrtex Sud-Est.

- 7- Un cop finalitzada l'electroforesi, es recuperen els *inserts* de l'interior dels pouets del gel amb l'ajut d'una pipeta Pasteur i es dipositen en tubs amb TE. La relació tampó TE/*insert* ha de ser d'1. Es guarda a 4 °C fins a la seva utilització.
- 8- Es passa el gel a una safata amb 500 mL de TBE 0.5x i 50 µL de Bromur d'Etidi (10 mg/mL), deixant-lo tenyir durant 20 min.
- 9- Es renta el gel amb 500 mL de tampó TBE 0.5x durant 20 min i s'observa el resultat de l'electroforesi en un transil·luminador de llum ultraviolada.

Neteja dels *inserts* procedents del protocol 2

- 1- Un cop finalitzada la incubació amb la solució ESP+ proteïnasa K, es treu aquesta amb l'ajut d'una pipeta Pasteur. S'afegeix tampó TE, en la proporció d'1 mL de tampó/*insert* i, si és possible, es posa en agitació suau (125 rpm) i en fred. També es pot transferir directament els *inserts* a un tub amb TE; d'aquesta manera serà més fàcil eliminar la proteïnasa K i els detergents.
- 2- Es fan successius rentats durant un dia i mig (de 5 a 6 rentats).
- 3- Es guarda a 4°C en tampó TE fins a la seva utilització.

d) Digestió del DNA inclòs en l'*insert*

Els membres del gènere *Pseudomonas* són microorganismes amb un alt contingut de G+C (West i Iglewski 1988) i el tetranucleòtid CTAG hi està present un ordre de magnitud menys freqüentment que el calculat per a les freqüències mononucleòtides (McClelland i col. 1987). Qualsevol endonucleasa que reconegui A, T o A, T a més de CTAG serà un enzim adequat per tallar en poca freqüència (Grothues i Tümmler 1991). Per aquest motiu, en el nostre treball van escollir-se inicialment els enzims *DraI*, *SpeI*, *XbaI*, *NheI* i *SwaI*. Les dianes de reconeixement dels enzims *DraI* i *XbaI* es localitzen majoritàriament en regions que no són codificants, mentre que per a l'enzim *SpeI* es troben tant en regions codificants com no codificants (Grothues i Tümmler 1991).

La digestió del DNA per l'enzim de restricció té lloc també en el mateix *insert* gràcies a la difusió de l'enzim en el bloc d'agarosa. La digestió es va realitzar segons el mètode descrit per Smith i col. (1988). Tal i com s'ha indicat es varen assajar els enzims de restricció de tall poc freqüent, *SwaI*, *XbaI*, *NheI*, *SpeI* i *DraI* (Taula 4.6).

Taula 4.6 Enzims de restricció emprats i les seves seqüències de reconeixement.
Table 4.6 Restriction enzymes used and their recognition sequences.

Enzim	U/ μ L	Diana de tall	Reacció de restricció (μ L)					Temperatura d'incubació ($^{\circ}$ C)
			Tampó	BSA*	H ₂ O	Enzim	Mostra	
<i>DraI</i>	10 U/ μ L	TTT/AAA	20	1	143.5	2.5	33	37
<i>NheI</i>	5 U/ μ L	G/CTAGC	20	1	140	6	33	37
<i>SwaI</i>	10 U/ μ L	ATTT/AAAT	20	1	143.5	2.5	33	25
<i>SpeI</i>	3 U/ μ L	A/CTAGT	20	1	137	9	33	37
<i>XbaI</i>	10 U/ μ L	T/CTAGA	20	1	2143.5	2.5	33	37

*Albúmina de sèrum boví

*Bovine albumin serum

Procediment :

- 1- Es posa en un microtub de fons cònic el volum d'aigua mQ (μ L en funció del volum d'enzim necessari). El volum final total ha de ser de 200 μ L, 20 μ L del tampó de restricció de l'enzim a utilitzar (d'un tampó 10x), 1 μ L de BSA (10 mg/mL), 1/3 part de l'*insert* (assumint un volum de 33 μ L) (veure detalls a la taula 4.6)
- 2- Es manté d'1 a 2 h a 4 $^{\circ}$ C per permetre que l'*insert* s'equilibri amb el tampó adient per a l'enzim de restricció.
- 3- Es posen de 20 a 30 U de l'enzim (els μ L variaran depenent de la concentració de cada un, veure les quantitats que van emprar-se a la taula 4.6).
- 4- S'incuba unes 15 h a la temperatura òptima de cada enzim.

L'aturada de les restriccions permet l'emmagatzematge de l'*insert* durant un temps limitat (donat que si els fragments de macrorestricció obtinguts en la digestió són petits, un llarg emmagatzematge permet l'elució d'aquests fragments del bloc d'agarosa).

- 1- S'afegeix a cada microtub microtub 12.5 μ L d'EDTA 0.5 M pH 9- 9.5.
 - 12.5 μ L Sarcosyl 20 %.
 - 25 μ L de proteïnasa K (10mg/mL en aigua mQ estèril).
- 2- S'incuba 2 h a 50 $^{\circ}$ C.
- 3- Es mantenen a 4 $^{\circ}$ C fins al seu ús.

e) Electroforesi

Les electroforesis van realitzar-se amb els equips Pulsaphor Plus 2015 i Gene Navigator (Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) amb la font d'electroforesi EPS 500/400 (Pharmacia-LKB Biotechnology). Es va utilitzar el sistema anomenat CHEF (Chu i col. 1986), en la que els elèctrodes estan disposats en un suport hexagonal. La cubeta d'electroforesi es va connectar a un circuit de refrigeració per aigua per mantenir la temperatura del tampó entre 12-15 $^{\circ}$ C.

Per a la preparació del gel d'electroforesi es procedeix com es descriu a continuació:

- 1- Per obtenir un gel d'agarosa a l'1.25 % en tampó TBE 0.5x, es prepara un volum total contenint:
 - 110 mL d'aigua mQ (no cal que sigui estèril)
 - 1.4 g d'agarosa (Sea-Kem ® ME Agarose de RMC® Bioproducts, Maine. U.S.A.)
 - 5.5 mL de tampó TBE 10
- 2- S'escalfa al microones fins a ebullició, comprovant que el volum final és de 110 mL en total. Es deixa refredar uns 20 min vigilant que no solidifiqui.
- 3 S'aboca en el motlle del gel d'electroforesi que prèviament ha estat netejat amb etanol, i s'espera que solidifiqui.

La càrrega dels *inserts* bacterians digerits en el gel es va realitzar seguint el protocol:

- 1- Es recupera l'*insert* digerit i emmagatzemat a 4 °C, amb l'ajut d'una pipeta Pasteur i es diposita damunt la cara interior d'un tros de parafilm.
- 2- Amb l'ajut d'un cubreobjectes, es talla un tros d'*insert* en la direcció més ampla (1/3 part de l'*insert*)
- 3- Amb una pipeta Pasteur, es col·loca la làmina tallada al damunt del cubreobjectes.
- 4- La làmina es diposita a l'interior del pouet del gel, anant en compte de no trencar-la, i dipositant-la en la part frontal i tocant a la base.
- 5- Es segella el pouet amb agarosa (Sea-Kem ® ME Agarose de RMC® Bioproducts) al 0.5 % en tampó TBE 0.5x.
- 6- En els pouets laterals i en el central es dipositen els marcadors adients per a cada carrera. En aquest treball, i degut al rang dels fragments resolts, es van posar dos marcadors diferents a cada gel per tal de determinar la recta de regressió: en algunes electroforesis es van emprar els marcadors que corresponen als cromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast chromosome PFGE marker) i els concatàmers del fag lambda (Lambda ladder PFGE marker). En altres electroforesis es van utilitzar els concatàmers del fag lambda i els concatàmers del fag lambda junt amb fragments de lambda digerits amb *HindIII* (Low ranger PFG Marker) (Tots de New England Biolabs, Maine. U.S.A.. La mida de les bandes es detalla a l'annex 4).

El tampó utilitzat en la cubeta és el mateix que l'utilitzat per preparar el gel (TBE 0.5x). Les condicions de carrera van canviar-se en funció del rang dels fragments que es volien resoldre. Així, depenent de l'enzim emprat en les restriccions, van utilitzar-se polsos:

-constants de 5 o 8 s amb un voltatge de 250 V i de 21 h de durada en els *inserts* on s'havia emprat *XbaI*, *SpeI*, *DraI* o *NheI* (alternativament s'activa el camp elèctric en la direcció N/S i E/O per un període de temps constant).

-amb rampes de temps (de 5 a 50 s amb un voltatge de 250 V i de 21 h de duració) en els *inserts* on s'havia emprat l'enzim *SwaI*. El camp elèctric s'activa alternativament en la direcció N/S i E/O i en un temps que va variant, en l'exemple començarien a alternar-se els camps elèctrics durant 5 s, seguit de 5.1 s, 5.2, 5.3 ...i així successivament fins a una durada de 50 s).

En la tècnica de la PFGE, s'ha observat que el bromur d'etidi retarda la migració dels fragments i redueix el rang de mides separades sota un conjunt de condicions. Per aquest motiu, en la PFGE els gels es tenyeixen després de la carrera electroforètica en lloc d'incloure el bromur d'etidi en el gel. Es procedeix de la següent manera:

- 1- Es passa el gel a una safata amb 500 mL de TBE 0.5x i 50 µL de Bromur d'Etidi (10 mg/mL), deixant-lo tenyir durant 20 min.

- 2- Es renta el gel amb 500 mL de tampó TBE 0.5 x durant 20 min.
- 3- La visualització i obtenció d'imatges s'ha realitzat de dues maneres diferents en el transcurs del treball:
 - mitjançant un transil·luminador de llum ultraviolada i obtenció de fotografies utilitzant un sistema Polaroid 667.
 - adquirint la imatge digitalment amb un analitzador d'imatges Gel 1000 Document de Biorad (Bio-rad Laboratories U.S.A.) acoblat a un ordinador.

f) Anàlisi de les imatges obtingudes en la PFGE

Un cop obtinguts els gels, el càlcul de la mida dels fragments de restricció resolts per a cada soca bacteriana, es va estimar mitjançant la interpolació de la distància respecte al front del pouet on es va introduir l'*insert*, en una recta de regressió. Aquesta recta es va obtenir relacionant les distàncies de les bandes dels marcadors amb la seva mida. La mesura de les distàncies en el gel es va realitzar amb el programa Molecular AnalystTM/PC (Versió 1.4 de Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) amb les imatges dels gels digitalitzades.

En aquest treball, i com a mètode escollit per a la caracterització de les soques, es van analitzar els gels obtinguts amb les digestions dels *inserts* amb l'enzim *Swal*. Les mides dels fragments resolts van oscil·lar entre les 48 i 680 Kb utilitzant una rampa de temps de 5 a 50 s durant 21 h a 250 V. Amb l'objectiu de compensar els errors experimentals en la mesura dels fragments, es va dividir el rang resolt en 49 intervals, començant amb 44 intervals de 12.125 Kb a partir de 48 Kb i acabant amb un interval de 18 Kb i 3 intervals de 20 Kb per arribar a les 680 Kb, semblant al protocol utilitzat per Davis i col. (1997). Una banda de DNA era assignada a un d'aquests intervals segons el resultat obtingut en la interpolació en la recta de regressió.

g) Tractament de les dades

El tractament de les dades es va realitzar igual que en el subapartat f) de l'apartat 4.2.2.1

4.2.3 Estudi de l'estabilitat del patró de MRFLP-PFGE i aplicació a la identificació d'una soca bacteriana inoculada i reaïllada

Amb l'objectiu de verificar l'estabilitat del patró de macrorestricció es va utilitzar com a model la soca *P. fluorescens* EPS288 degut al seu interès com a potencial ACB (Bonaterra 1997).

4.2.3.1 Estabilitat del patró en condicions de laboratori

Es van realitzar *inserts* de la soca sotmesa a diferents condicions de laboratori per a l'obtenció dels fragments de macrorestricció, seguint el protocol 2 descrit en l'apartat anterior.

Les condicions de cultiu estudiades van ser les següents :

Temperatura: 6, 15, 25 i 35 °C, en brou LB

pH : 5,6,7,8 i 9, en brou LB

Medis líquids : brou KB, MM1 i MM2

Medis sòlids : agar KB i LB

Així mateix, es van utilitzar cultius vells que es van incubar durant 1 setmana a temperatura ambient (21°C).

4.2.3.2 Identificació de *P. fluorescens* EPS288 reaïllada a partir de mostres naturals i diversos materials inoculats

En aquest apartat es va emprar la tècnica per a identificar la soca inoculada en diferents sistemes, emprant la tècnica de la PFGE .

a) Fruits

Per a portar a terme aquest estudi van inocular-se els fruits amb un mutant espontani de la soca *P. fluorescens* EPS288 resistent a rifampicina, que no va presentar diferències respecte a la soca salvatge en una sèrie de característiques bioquímiques i espectre d'antagonisme (Bonaterra 1997).

L'estabilitat del patró de macrorestricció de *P. fluorescens* EPS288 rif⁺ es va determinar en les ferides i superfície de fruits durant l'emmagatzematge en les condicions normals de frigoconservació en una central hortofructícola i, en ferides i superfície a 19 °C en condicions controlades en el laboratori.

Per a la preparació de la suspensió bacteriana el bacteri es va sembrar en plaques de LB amb rifampicina (50 µg/mL) i es va incubar durant 24 h a 22 °C. A continuació es va preparar una suspensió de la soca en H₂O estèril i la concentració es va ajustar mesurant una absorbància a 620 nm de 0.5 (que correspon a 5·10⁸ ufc/mL).

Com a material vegetal es van utilitzar pomes de la varietat Golden i peres de la varietat Passe Crassane. Els fruits es van desinfectar amb H₂O corrent i lleixiu (1 %), i es van rentar amb H₂O corrent amb un últim rentat amb H₂O estèril. En tots els casos els rentats van ser d'1 min de durada. A continuació es van provocar ferides en els fruits introduint una agulla emmanegada a 1 cm de profunditat. Els fruits es van inocular per immersió durant 1 min en la suspensió bacteriana. En el cas de les pomes es va realitzar un tractament amb la inoculació del bacteri (tractament biològic). En el cas de les peres es van realitzar dos tractaments, el biològic i un tractament mixt que va consistir en la combinació del bacteri amb els fungicides comercials Decozil S 7'5 (Atochem España, S.A. Madrid. España) i Ortho Phaltan 80 W (Agrocros, S.A. Madrid. España), que contenen les matèries actives imazalil i folpet, respectivament. En ambdós casos es van deixar fruits com a testimonis sense aplicar cap dels tractaments. Es van dur a terme assaigs diferents entre pomes i peres. En el tractament mixt, un cop desinfectats i ferits els fruits, es van submergir primer en una solució dels fungicides Decozil S-75 i Ortho Phaltan 80 W a un 1/4 de la dosi comercial utilitzada normalment en aquests tipus de tractaments (0.5 % i 0.10 % de matèria activa, respectivament). A continuació es va inocular el bacteri també per immersió dels fruits. Quant a l'assaig en condicions de laboratori, un cop desinfectats els fruits es van partir en dues meitats, dipositant-les en una safata on hi havia un paper de filtre humitejat i inoculant 15 µL de la suspensió bacteriana en cada una de les ferides cilíndriques.

Les condicions d'incubació de les cambres d'emmagatzematge de fruits van ser :

- atmosfera controlada (1.25 % O₂, 1.5 % CO₂ i 0.8 °C) en pomes de la varietat Golden.
- atmosfera modificada en fred (a -1 °C), en peres de la varietat Passe Crassane. La fruita es trobava emmagatzemada en palots embolcallats de plàstic; doncs així s'aconsegueix que la respiració dels fruits provoqui la disminució d'O₂ i l'augment de CO₂.

La temperatura d'incubació al laboratori va ser de 19 °C.

Per a la recuperació dels bacteris en els fruits sotmesos a condicions de frigoconservació es van extreure cilindres, en llocs amb i sense ferida, amb un trepant (1 cm de diàmetre). Aquests cilindres es van tallar a l'altura de 1.75 cm i es van homogeneïtzar juntament amb 15 mL de tampó d'extracció peptonat amb un homogeneïtzador de pales. Es va realitzar un banc de dilucions, sembrant en superfície en plaques d'agar LB amb rifampicina. L'obtenció de mostres es va

realitzar en els següents moments (1) un dia després de la inoculació, havent mantingut els fruits a 20 °C, (2) després de 116 i 128 dies d'estar sotmeses a les cambres de frigoconservació, i (3) al cap de 12 dies en els que es van deixar a temperatura ambient després d'haver passat 128 dies dins les cambres de frigoconservació. En el cas de les peres, es va realitzar (1) un dia després de la inoculació, havent mantingut els fruits a 20 °C, i (2) al cap de 152 dies d'haver estat sotmeses a les condicions de les cambres de frigoconservació, tant en el tractament biològic com el mixt. Per a la recuperació de les cèl·lules en les peres incubades a 19 °C, es van extreure 3 cilindres del fruit i es van processar com en el punt anterior. Les mostres es van prendre a les 14, 42, 94, 166 i 334 h després de la inoculació.

b) Sòl

Es va partir d'un sòl no estèril, assecat a l'aire i tamisat amb un sedàs de 2 mm. Es van prendre 50 g d'aquest sòl i en el transcurs d'una setmana es va portar a una humitat corresponent a 2/3 parts de la seva capacitat de camp.

Per a la inoculació es va preparar una suspensió del bacteri tal com s'ha descrit en el cas de la inoculació dels fruits, aplicant 5 mL de la suspensió en el sòl i aquest es va incubar dins un flascó de vidre durant 28 dies a 15 °C (E.Vinyeta no publicat).

Per a la recuperació de les cèl·lules bacterianes es va realitzar una extracció amb tampó fosfat, seguit d'un banc de dilucions i sembra en superfície en agar LB amb rifampicina.

c) Immobilització en una matriu d'alginat sobre una resina de suport

A partir d'una resina esfèrica catiónica calcificada amb $\text{Ca}(\text{OH})_2$, es va procedir a fer un embolcallament de la resina amb una barreja d'alginat i una suspensió de cèl·lules bacterianes. Posteriorment, les esferes es van rentar amb aigua i es van endurir amb l'addició de CaCl_2 al 2 % durant 30 min i es va fer un rentat per eliminar les cèl·lules que no estaven incloses en la matriu d'alginat. Amb l'objectiu d'augmentar al màxim el nombre de bacteris inclosos es van recollir les esferes i es van incubar durant 24 h en KB líquid. Després de dos rentats es van emmagatzemar en un dessecador amb NaOH sòlid.

Per a la recuperació dels bacteris, es va provocar la dissolució de l'alginat en citrat sòdic (a l'1 %, pH 7) durant 2 h, fent petits polsos de vòrtex durant el procés. Es va realitzar el banc de dilucions adient, sembrant en superfície en plaques de KB. Tot el protocol es va realitzar en condicions d'esterilitat (tot el material també va ser autoclavat amb l'excepció de l'alginat que solament es va bullir). Aquesta simplificació del protocol correspon a un treball realitzat en el grup de recerca

consistent en aïllar la soca al cap d'1 i 22 mesos després de la immobilització (E. Recas, no publicat).

Un cop es van obtenir colònies en les plaques de KB, aquestes es van seleccionar a l'atzar inoculant-les en brou LB i seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.1 (protocol 2) es van obtenir els patrons de bandes per PFGE corresponents als bacteris reaïllats.

4.2.4 Caracterització genotípica d'un grup de soques productores de l'antibiòtic floroglucinol

Per aprofundir en el coneixement de les relacions existents entre les soques productores de floroglucinol emprades en aquest treball es van portar a terme les mateixes anàlisi que en els apartats anteriors (4.2.1 i 4.2.2) juntament amb una anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats de *phlD*. A més es va realitzar la seqüenciació d'aquest gen. Les soques emprades es descriuen en la taula 4.7.

Taula 4.7 Soques de *Pseudomonas fluorescens* productores de floroglucinol utilitzades en aquest treball.
Table 4.7 *Pseudomonas fluorescens* phloroglucinol producing strains used in this work.

Soca	Material d'aïllament	Hoste	País d'origen	Font
Q ₂₋₈₇	arrel	blat	U.S.A	Linda Thomashow
Q ₄₋₈₇	arrel	blat	U.S.A	Linda Thomashow
JB170	arrel	blat	Holanda	Jos J. Raaijmakers
JMP1284	arrel	blat	Holanda	Jos J. Raaijmakers
Ps15	arrel	canya de sucre	Dinamarca	Mette Neiendam Nielsen
Ps31	arrel	canya de sucre	Dinamarca	Mette Neiendam Nielsen
WB1	arrel	tomata	Alemanya	Walid Fakhouri
WB52	arrel	tomata	Alemanya	Walid Fakhouri
CHA0	arrel	tabac	Suïssa	Genieve Défago
EPS317	arrel	tabac	Espanya	INTEA
EPS807	arrel	portaampelts perera	Espanya	aquest treball
EPS808	arrel	portaampelts perera	Espanya	aquest treball
EPS812	arrel	portaampelts perera	Espanya	aquest treball
EPS817	arrel	portaampelts perera	Espanya	aquest treball

4.2.4.1 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR del gen *phlD* (RFLP-*phlD*)

Es va procedir a l'obtenció dels amplificats del gen *phlD* de totes les soques amb el protocol descrit en l'apartat 2.2.3.2 del Capítol 2. Les digestions dels amplificats es van realitzar amb els mateixos enzims que en les restriccions del 16S rDNA+ITS de l'apartat 4.2.2.1, utilitzant els mateixos mètodes per a la resolució dels fragments en gels d'agarosa, visualització dels resultats i tractament de les dades del mateix apartat.

A més, es van emprar les dades obtingudes en el Capítol 2 sobre les restriccions del gen *phlD* amb els enzims *SalI* i *BspHI*.

4.2.4.2 Seqüenciació

Es va seqüenciar el gen *phlD* de les soques que es descriuen en la taula 4.7. Dels aïllats obtinguts en el present treball, solament se'n han seleccionat 4 degut a que varies de les soques eren genèticament idèntiques segons la caracterització genòmica prèvia, i per tant es van descartar. Pel que fa referència a les soques EPS1016 i EPS1019, en el moment de realitzar aquesta part del treball no havien estat encara caracteritzades com a portadores del gen.

Seqüenciació del gen *phlD*

Per a l'obtenció del DNA motlle que s'empra en la reacció de seqüenciació, es va procedir de la següent manera:

- 1- S'obtenen els fragments amplificats del gen *phlD* amb el protocol descrit en l'apartat 2.2.3 del capítol 2.
- 2- Es carreguen les mostres en un gel d'agarosa, es realitza l'electroforesi, es tenyeix amb Bromur d'etidi i es visualitza en un transil·luminador amb el mateix protocol de l'apartat 2.2.3 del capítol 2.
- 3- Sota la il·luminació amb llum ultraviolada, es ressegueix el perfil de la banda d'interès amb un bisturí, es retalla el fragment del gel que conté la banda i es posa en un microtub que prèviament s'ha pesat.
- 4- Es pesa el microtub que conté l'agarosa, i es procedeix a la neteja i purificació del DNA amb el Gen Clean II® (BIO 101 Inc.) , relacionant els g d'agarosa amb la quantitat de INa (1g d'agarosa : 3 mL de Ina; p.e. 0.12 g d'agarosa + 350µ L d' INa).
- 5- S'escafa 5 minuts a 52-55 °C per fondre l'agarosa i s'afegeixen 10 µL de la reina de sílice (abans de prendre, es resuspen al vòrtex). A partir d' aquí és realitza el mateix protocol a partir del pas 2 que en l'apartat 2.2.3, (subapartat c₂) del capítol 2.

La reacció de seqüenciació es va portar a terme amb l'ús del ddNTP ABI PRISM TM. Per a cada reacció es va preparar un microtub de PCR de 0.2 mL amb la barreja (per aquest ordre):

El volum total de la reacció va ser de 10 µL.

<u>Component</u>	<u>µL/tub de reacció</u>
H2O Milli-Q estèril	3.25
encebador (10 pm/µL)	0.25
DNA motlle	2.5
Term ready mix	5
S'afegeixen a la part superior del tub 20 µL d'oli mineral.	

La reacció de PCR per a la seqüenciació es va portar a terme amb el termociclador Minicycler™ (MJ Research), amb el següent programa.:

Etapes	T°(C)	Temps (s)
1	96	120
30 cicles	96	30
	50	15
	60	240
1	4	Indefinidament

Un cop obtinguts els amplificats, es va realitzar una precipitació amb etanol, tal com es descriu a continuació:

- 1- Es treuen el 10 µL de fase aquosa i es posen en un nou microtub.
- 2- S'afegeixen 9.5 µL de Clorur Magnesi 2 mM, i 55 µL d'etanol absolut, es fa un pols de vòrtex suau.
- 3- S'incuba 15 min a temperatura ambient.
- 4- Se centrifuga 20 min a 12.000 g.
- 5- S'aspira l'efluent amb l'ajut d'un capil·lar fet manualment amb una pasteur.
- 6- Es deixa a temperatura ambient uns 10 minuts i es guarda a -20 °C fins al moment de la seva utilització.

Una o dues hores abans de seqüenciar, es procedeix a la resuspensió de la reacció de seqüenciació:

- 1- S'afegeixen 25 µL de tampó TSR a cada tub eppendorf anant en compte de no produir bombolles.
- 2- S'incuba 10 minuts sense moure-ho a temperatura ambient i a foscor.
- 3- S'agita al vòrtex 10 segons.
- 4- Incubar 3 minuts a 94°C per separar les dobles cadenes de DNA i immediatament es posa en gel.
- 5- Transferir a un nou tub per al seqüenciador i es guarda a la nevera i en foscor fins al moment d'injectar la mostra al seqüenciador.

El seqüenciador emprat ha estat un ABI PRISM TM 310 Genetic Analyzer (PE BioSystems), utilitzant un capil·lar llarg. Les reaccions de seqüenciació es van realitzar en els dos sentits.

Tractament de les seqüències

Tot i el fet de disposar de soques ja representatives de diferents orígens geogràfics i d'altres soques ben referenciades a la bibliografia, i donat que altres investigadors han estat seqüenciant el mateix gen, es va decidir d'extreure les seqüències de soques que nosaltres no disposàvem però dipositades al GenBank. A la taula 4.8 es mostren els codis d'accés a les seqüències així com referències de les soques.

Un cop obtingudes les seqüències i alineades manualment de forma preliminar, es va procedir a acabar de realitzar l'alineament amb el programa Bioedit ver. 4.8.5 (Hall 1999). Amb el programa

DNA sp. ver. 3.00.0 és va calcular la diversitat nucleotídica π (en tant per 1). La diversitat nucleotídica (Nei i Li 1979) es defineix com el nombre mitja de diferències nucleotídiques per a cada parell de bases entre les diferents seqüències i es calcula segons la fórmula:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum P_i P_j \pi_{ij}$$

sent

π l'índex de la diversitat nucleotídica entès com una mesura de la diversitat molecular del gen.

P_i és la freqüència del nucleòtid en la seqüència i

P_j és la freqüència del nucleòtid en la seqüència j

π_{ij} és la proporció de nucleòtids diferents entre les seqüències i i j

n és el nombre de seqüències

Taula 4.8 Soques de *Pseudomonas* de les que es disposa de les seqüències del gen *phlD*. Font: GenBank.
Table 4.8 *phlD* available sequences from *Pseudomonas* strains. From: GeneBank.

Soca	Codi accés Genbank*	Arrel de	País d'origen	Referències
<i>P. fluorescens</i> F113	AJ278811	canya de sucre	Irlanda	Shanahan i col. 1992
<i>Pseudomonas</i> sp. PILH1	AJ278810	tomata	Itàlia	Keel i col. 1996
<i>Pseudomonas</i> sp. P1TR	AJ278809	blat	Itàlia	Keel i col. 1996
<i>Pseudomonas</i> sp. CM1'A2	AJ278808	cogombre	Suïssa	Keel i col. 1996
<i>P. fluorescens</i> Q65c-80	AJ278807	blat	Washington	Harrison i col. 1993
<i>P. fluorescens</i> Pf5	AF214457	cotó	Texas	Nowak-Thompson i col. 1994
<i>P. fluorescens</i> CHA0	AF214456 AJ278806	tabac	Suïssa	Keel i col. 1992
<i>Pseudomonas</i> sp. UP61	AF214108	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. Q8r1-96	AF207693	blat	Washington	Raaijmakers i col.1997
<i>Pseudomonas</i> sp. M1-96	AF207692	-	-	-

(*) codis que comencen amb AF han estat seqüenciades per Ramette, A; Moenne-Loquez, I. and Défago, G. ; i amb AJ per Mcspadden, B.B.; Mavrodi, D.V. Sachs, E.; Tomashow, L.S. and Weller, D.

(*) codes which start with AF han been sequenced by Ramette, A; Moenne-Loquez, I. and Défago, G. ; and other with AJ by Mcspadden, B.B.; Mavrodi, D.V. Sachs, E.; Tomashow, L.S. and Weller, D.

- no s'han trobat referències bibliogràfiques d'aquestes soques

- we haven't found bibliographic references of these strain

A partir de les seqüències es va realitzar l'anàlisi basat en distàncies amb el càlcul de l'índex de Kimura de 2 paràmetres (donat en tant per 1) emprant el programa Mega 2.0 (Kumar i col. 2001). Aquest índex, dóna més valor a les transversions (el canvi d'una purina per una pirimidina o a l'inrevés) que no a les transicions (canvis entre purines o entre pirimidines). Un cop obtinguts els índexs i construïda la matriu binària es va realitzar la reconstrucció filogenètica amb el mètode del Neighbor-Joining, la robustesa de l'arbre obtingut va ser avaluat emprant un remostreig "bootstrap" de 1000. Aquest remostreig es basa en agafar una columna a l'atzar, corresponent a una posició determinada dins la seqüència, i posar-la en una altre posició de la seqüència (per exemple els

nucleòtids que corresponen a la posició 35 es canvien pels nucleòtids de la posició 250) i es repeteix l'anàlisi 999 vegades més.

4.3 Resultats

4.3.1 Anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció d'amplificats d'rDNA

El mètode d'extracció de DNA modificat de Keel i col. (1996) ens va permetre l'obtenció de DNA adient per amplificar en 70 de les 72 soques emprades. En dues de les soques (EPS317 i EPS264) va caldre un altre tipus d'extracció per aconseguir DNA per la posterior amplificació en la PCR. En les primeres proves que es van portar a terme es va observar que la Taq polimerasa emprada tenia un paper clau en l'obtenció d'una bona amplificació, en el sentit de no obtenir amplificacions inespecífiques de mida inferior a l'esperada. La Taq polimerasa que no va produir aquestes amplificacions inespecífiques va ser la Taq High Fidelity (Roche Diagnostics) i per tant va ser l'emprada finalment.

L'amplificació amb els encebadors FPGS6 i FGPL132', situats en l'extrem 5' del 16S rDNA i a una distància de 132 pb de l'extrem 5' del 23S rDNA, va permetre l'obtenció d'amplificats en la totalitat de les soques, obtenint l'amplificat conjunt del 16S rDNA amb l'espai intergènic i a més 132 pb del 23S rDNA, amb una mida entre els 2200 i 2300 pb.

En 68 de les 72 soques és va obtenir un sol fragment d'amplificació, mentre que en les 4 restants (EPS356, EPS373, EPS375 i EPS378) es van observar dos fragments de diferent mida en els gels d'electroforesi. Es va obtenir el mateix resultat després de verificar la puresa dels cultius bacterians i realitzar noves extraccions i reaccions d'amplificació. Donat que en *P. fluorescens* hi ha present més d'una còpia de l'operó ribosomal, es va decidir realitzar l'amplificació del fragment que correspon solament a l'espai ITS en aquestes soques amb els encebadors FGPS1490 i FGPL132' (situat el primer en l'extrem 3' del 16S rDNA). Es van obtenir de nou dos productes d'amplificació de mida diferent (490, 570 pb) que confirmaven la presència de dos tipus d' ITS en cada una de les 4 soques (Figura 4.4). En la resta de soques no es van observar diferents mides de l'amplificat.

Pel que fa referència a les restriccions dels fragments amplificats, es van portar a terme directament a partir dels resultats de la PCR i es van separar en agarosa convencional al 2.75 % ja que no es van observar diferències entre els diferents protocols i agarosa provats.

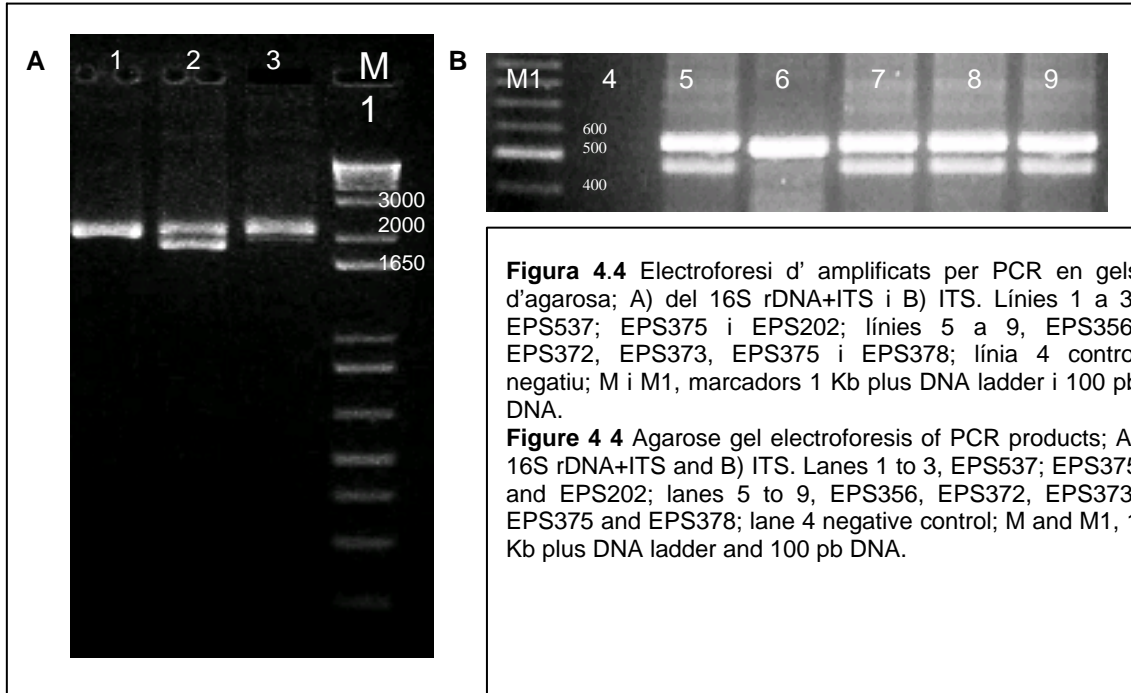


Figura 4.4 Electroforesi d' amplificats per PCR en gels d'agarosa; A) del 16S rDNA+ITS i B) ITS. Línies 1 a 3, EPS537; EPS375 i EPS202; línies 5 a 9, EPS356, EPS372, EPS373, EPS375 i EPS378; línia 4 control negatiu; M i M1, marcadors 1 Kb plus DNA ladder i 100 pb DNA.

Figure 4.4 Agarose gel electrophoresis of PCR products; A) 16S rDNA+ITS and B) ITS. Lanes 1 to 3, EPS537 and EPS202; lanes 5 to 9, EPS356, EPS372, EPS373, EPS375 and EPS378; lane 4 negative control; M and M1, 1 Kb plus DNA ladder and 100 pb DNA.

L'anàlisi dels polimorfismes en els fragments de restricció del DNA amplificat per a cada mostra es van realitzar emprant els enzims *Taq* I, *Nde* II, *Rsa* I i *Hae* III. Es van obtenir un total de 21 (*Hae* III), 16 (*Taq* I), 15 (*Nde* II) i 20 (*Rsa* I) posicions de bandes, la mida de les quals es mostra a la taula 4.8 A les figures 4.5, 4.6, 4.7 i 4.8 es poden observar alguns dels gels d'electroforesi obtinguts. A la figura 4.9 es mostren de manera esquemàtica els patrons de restricció per les 72 soques amb els 4 enzims utilitzats.

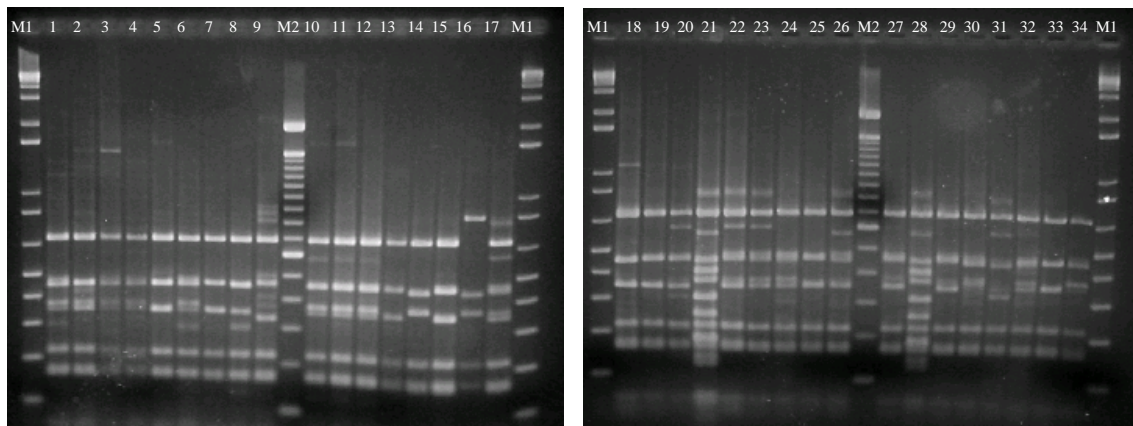


Figura 4.5 Electroforesi en gels d'agarosa (2.75%) de les restriccions dels amplificats 16S rDNA+ ITS amb l'enzim *Hae* III. Línies:

Figure 4.5 Agarose gel electrophoresis (2.75%) of amplified 16S rDNA+ ITS restriction patterns with *Hae* III. Lanes:

(1) EPS808, (2) EPS812, (3) EPS807, (4) EPS817, (5) JMP12-84, (6) Q69c-80, (7) EPS600, (8) Ps15, (9) M₄80-R, (10) Q₂₋₈₇, (11) Q₄₋₈₇, (12) EPS263, (13) Ps31, (14) EPS209, (15) EPS424, (16) WB1, (17) EPS537, (18) EPS381, (19) EPS383, (20) EPS385, (21) EPS356, (22) EPS532, (23) EPS539, (24) EPS288, (25) EPS298, (26) EPS301, (27) EPS340, (28) EPS373, (29) EPS550, (30) 2-79, (31) EPS318, (32) EPS230, (33) EPS379, (34) EPS289. M, marcadors, M1, 1 Kb plus DNA, M2, 100 pb DNA.

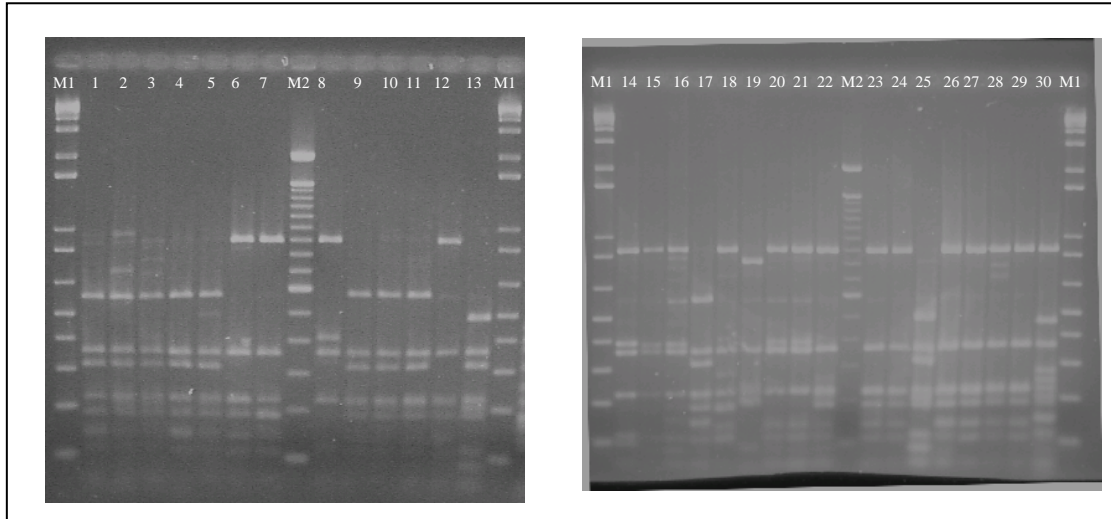


Figura 4.6 Electroforesi en gels d'agarosa (2.75%) de les restriccions dels amplificats 16S rDNA+ ITS amb l'enzim *Taq* I. Línies:

Figure 4.6 Agarose gel electrophoresis (2.75%) of amplified 16S rDNA+ ITS restriction patterns with *Taq* I. Lanes:

- (1) EPS812, (2) EPS807, (3) EPS817, (4) JMP12-84, (5) Q69c80, (6) EPS600, (7) Ps15, (8) M₄80-R, (9) Q₂₋₈₇, (10) Q₄₋₈₇, (11) EPS263, (12) Ps31, (13) EPS209, (14) BI915, (15) WB52, (16) CHA0, (17) JBR1-70, (18) CECT378, (19) CECT844, (20) CFBP2126, (21) CFBP2129, (22) CFBP2131, (23) SBW25, (24) CFBP2128, (25) EPS210, (26) EPS227, (27) EPS347, (28) EPS360, (29) EPS372, (30) EPS378; M, marcadors; M1, 1 Kb plus ladder, M2, 100 pb DNA ladder

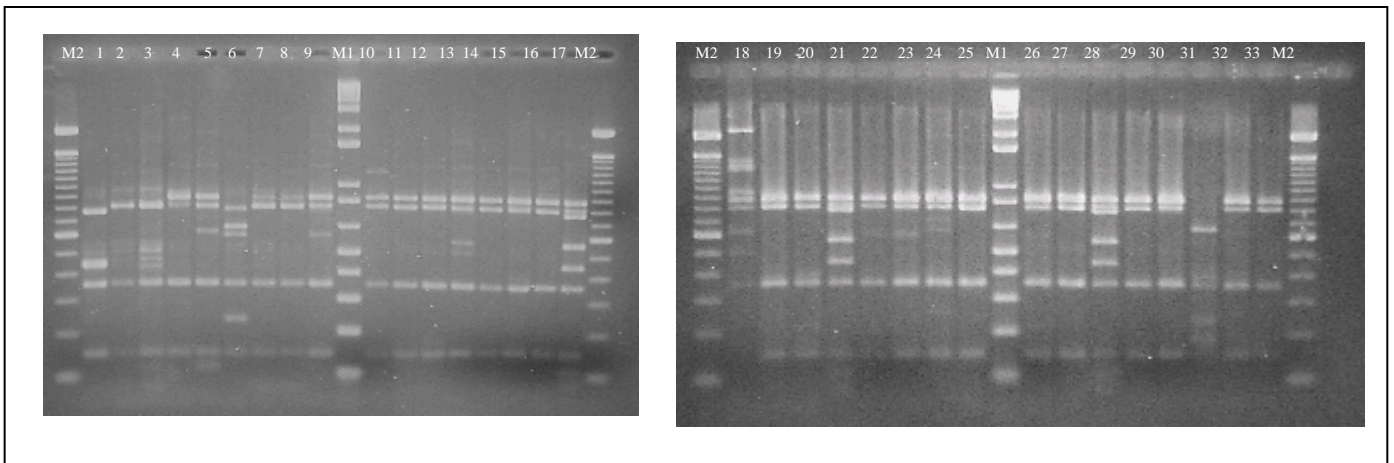


Figura 4.7 Electroforesi en gels d'agarosa (2.75%) de les restriccions dels amplificats 16S rDNA+ ITS amb l'enzim *Rsa* I. Línies:

Figure 4.7 Agarose gel electrophoresis (2.75%) of amplified 16S rDNA+ ITS restriction patterns with *Rsa* I. Lanes:

- (1) BI915, (2) WB52, (3) CHA0, (4) JBR1-70, (5) CECT378, (6) CECT844, (7) CFBP2126, (8) CFBP2129, (9) CFBP2131, (10) SBW25, (11) CFBP2128, (12) EPS210, (13) EPS227, (14) EPS347, (15) EPS360, (16) EPS372, (17) EPS378, (18) EPS381, (19) EPS383, (20) EPS385, (21) EPS356, (22) EPS532, (23) EPS539, (24) EPS288, (25) EPS298, (26) EPS301, (27) EPS340, (28) EPS373, (29) EPS550, (30) 2-79, (31) EPS318, (32) EPS230, (33) EPS379. . M, marcadors, M1, 1 Kb plus DNA, M2, 100 pb DNA.

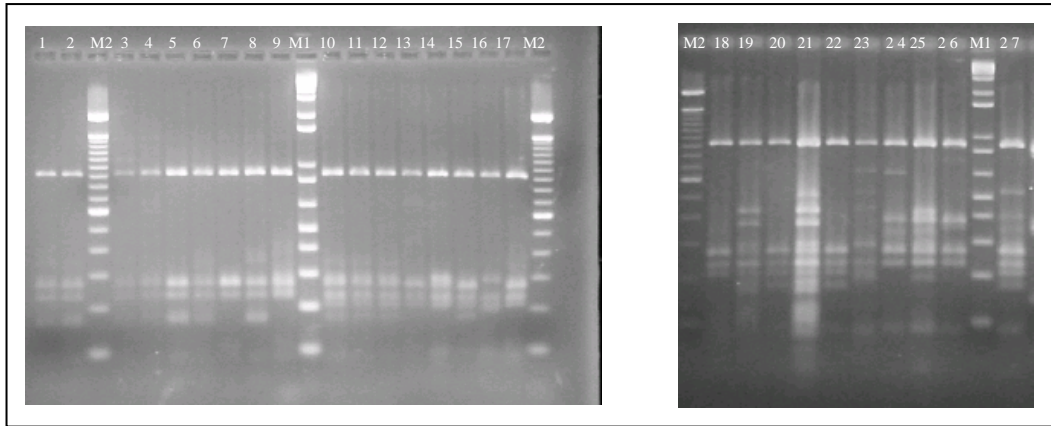


Figura 4.8 Electroforesi en gels d'agarosa (2.75%) de les restriccions dels amplificats 16S rDNA+ ITS amb l'enzim *Nde II*. Línies:

Figure 4.8 Agarose gel electrophoresis (2.75%) of amplified 16S rDNA+ ITS restriction patterns with *Nde II*. Lanes

(1) EPS808, (2) EPS812, (3) EPS807, (4) EPS817, (5) JMP12-84, (6) Q69c-80, (7) EPS600, (8) Ps15, (9) M₄80-R, (10) Q₂₋₈₇, (11) Q₄₋₈₇, (12) EPS263, (13) Ps31, (14) EPS209, (15) EPS424, (16) WB1, (17) EPS537, (18) EPS404, (19) EPS356, (20) EPS384, (21) EPS378, (22) EPS372, (23) CHA0, (24) EPS944, (25) EPS895, (26) EPS894, (27) EPS340. M, marcadors, M1 1 Kb plus DNA, M2 100 pb DNA.

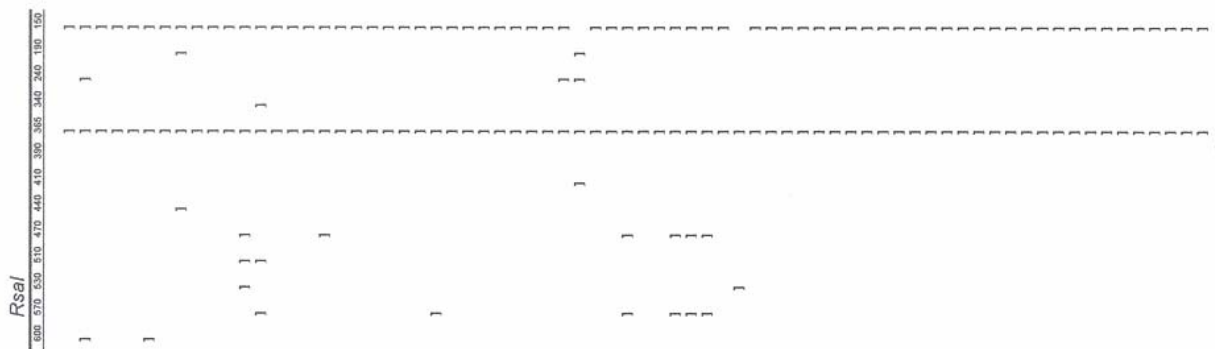
Taula 4.8 Posició de les bandes observades en el conjunt de les restriccions amb els quatre enzims emprats. Per la resolució dels gels no es van considerar els fragments més petits de 135 pb.

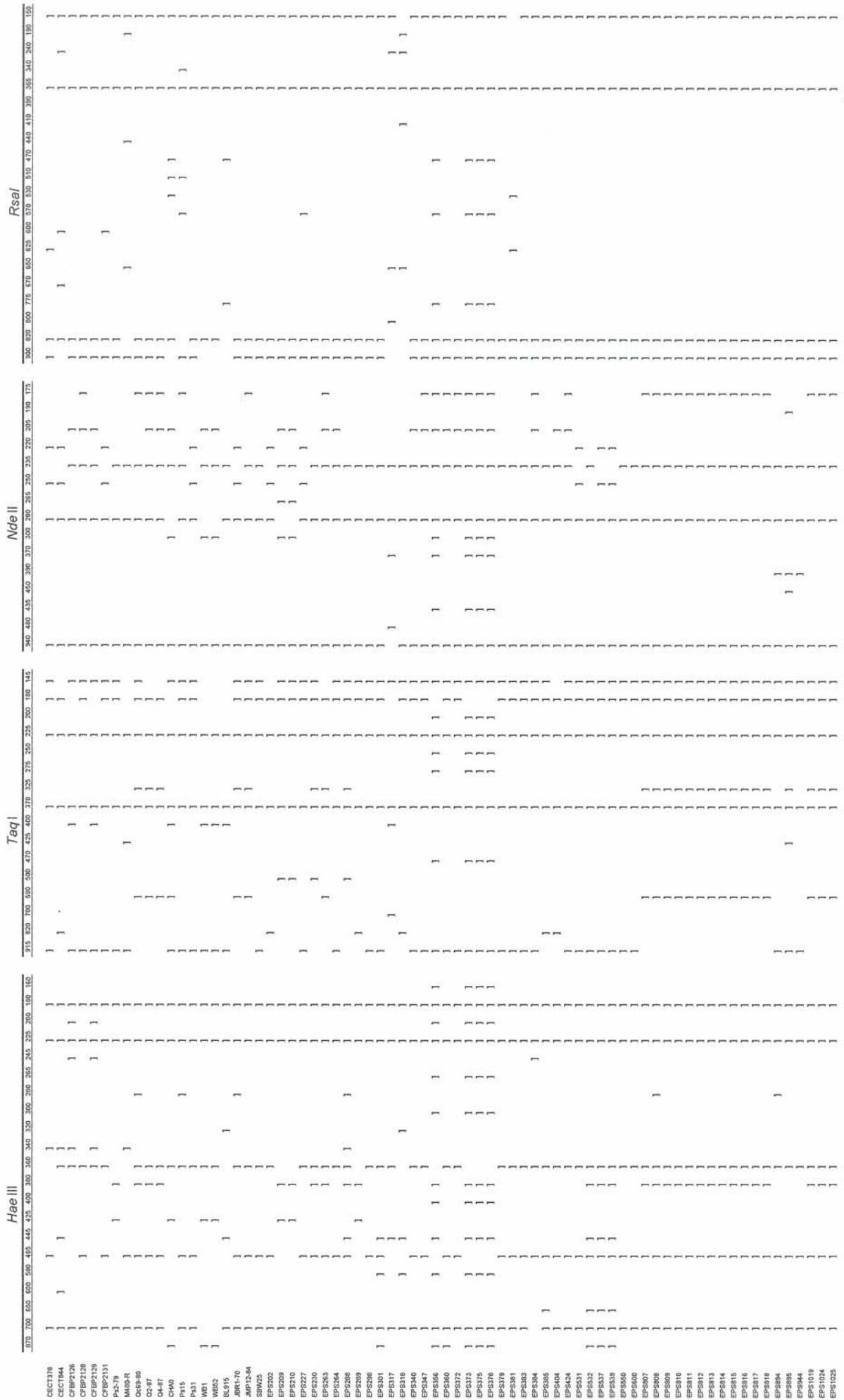
Table 4.8 Fragment sizes of PCR-RFLPs with the four enzymes assayed. Because of gel resolution, only fragments higher than 135 pb were considered

Nº	Enzim			
	<i>Hae III</i>	<i>Taq I</i>	<i>Nde II</i>	<i>Rsa I</i>
1	870	915	940	900
2	700	820	480	820
3	650	700	435	800
4	600	590	450	775
5	580	500	390	670
6	465	470	370	650
7	445	425	300	625
8	425	400	280	600
9	400	370	265	570
10	380	325	250	530
11	360	275	235	510
12	340	250	220	470
13	320	225	205	440
14	300	200	190	410
15	280	180	175	390
16	265	145	-	365
17	245	-	-	340
18	225	-	-	240
19	200	-	-	190
20	180	-	-	150
21	160	-	-	-

Pàgina següent/ Next page

Figura 4.9 Representació esquemàtica dels patrons de restricció per a cada una de les 72 soques emprades. Es detallen la mida dels fragments per a cada un dels enzims però sense mantenir l'escala numèrica de les mides.

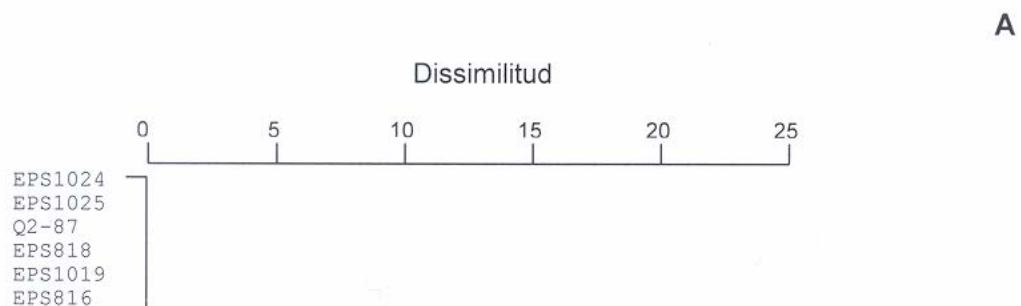


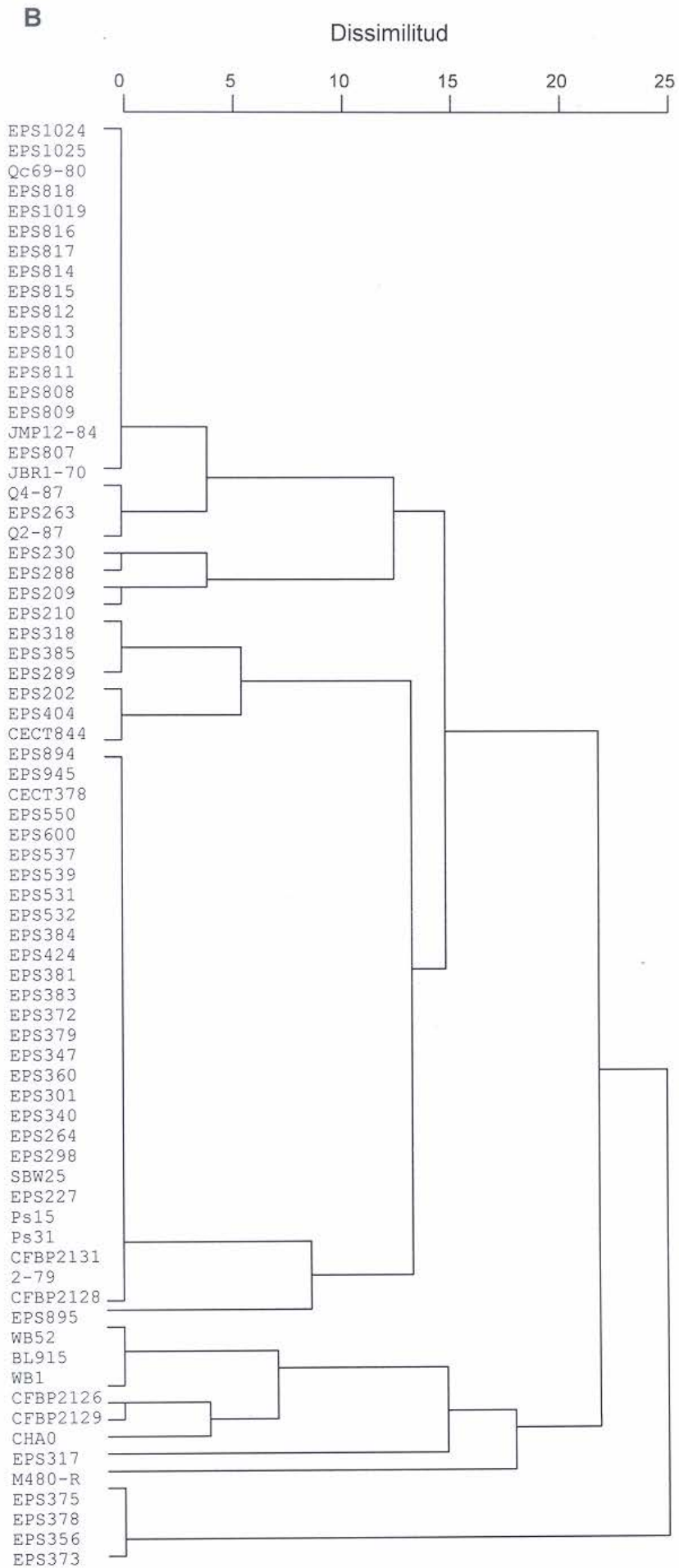


Pàgines següents / Next pages

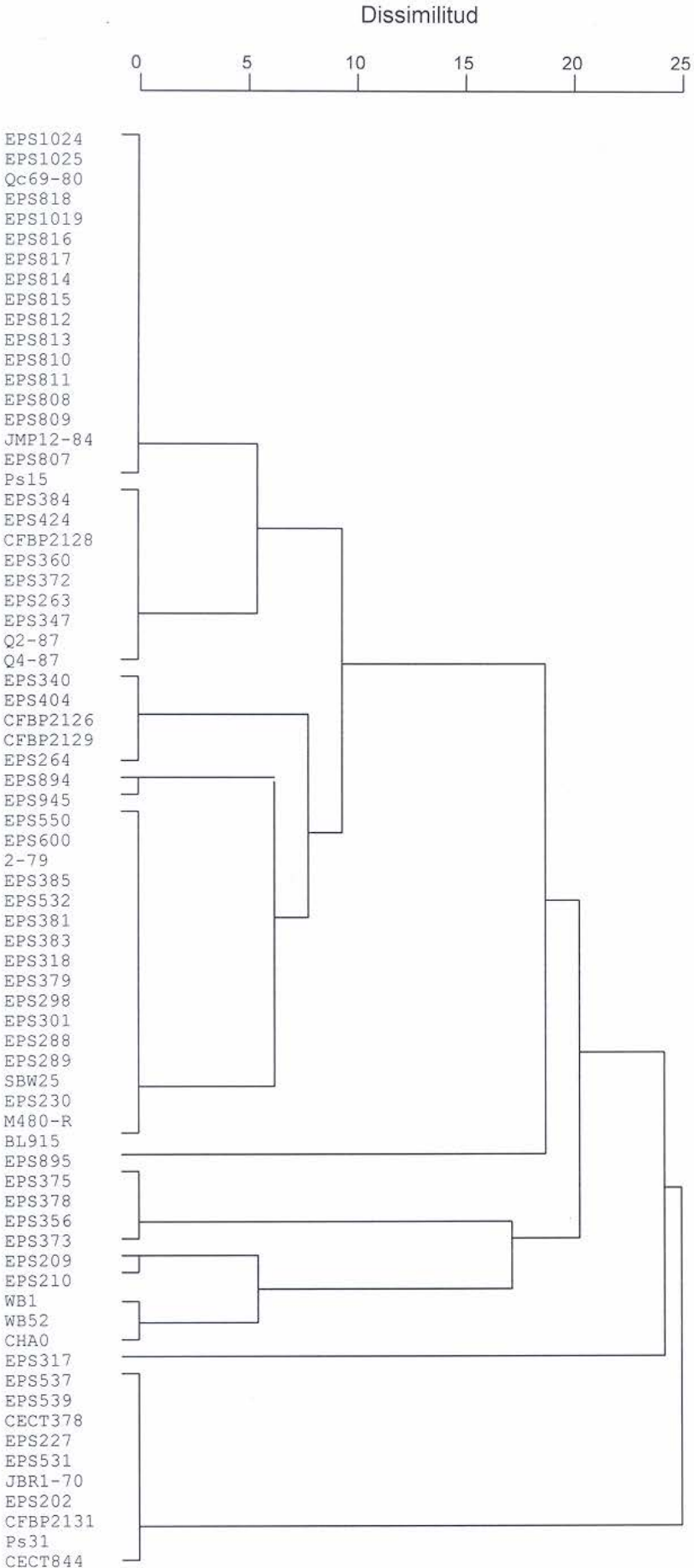
Figura 4.10 Dendrogrames de les agrupacions de les soques segons els patrons de restricció dels amplificats 16S rDNA + ITS amb els enzims *Hae* III (A), *Taq* I (B), *Nde* II (C) i *Rsa* I (D) emprant el coeficient de Dice. Les matrius del coeficient de Dice es mostren en l'annex 4. L'escala que es mostra és reescalada.

Figure 4.10 Dice cluster analysis of individual *Hae* III (A), *Taq* I (B), *Nde* II (C) and *Rsa* I (D) restriction patterns of amplified 16S rDNA + ITS of strains used in this study. Dice coefficient matrix is shown in annex 4. Escala be

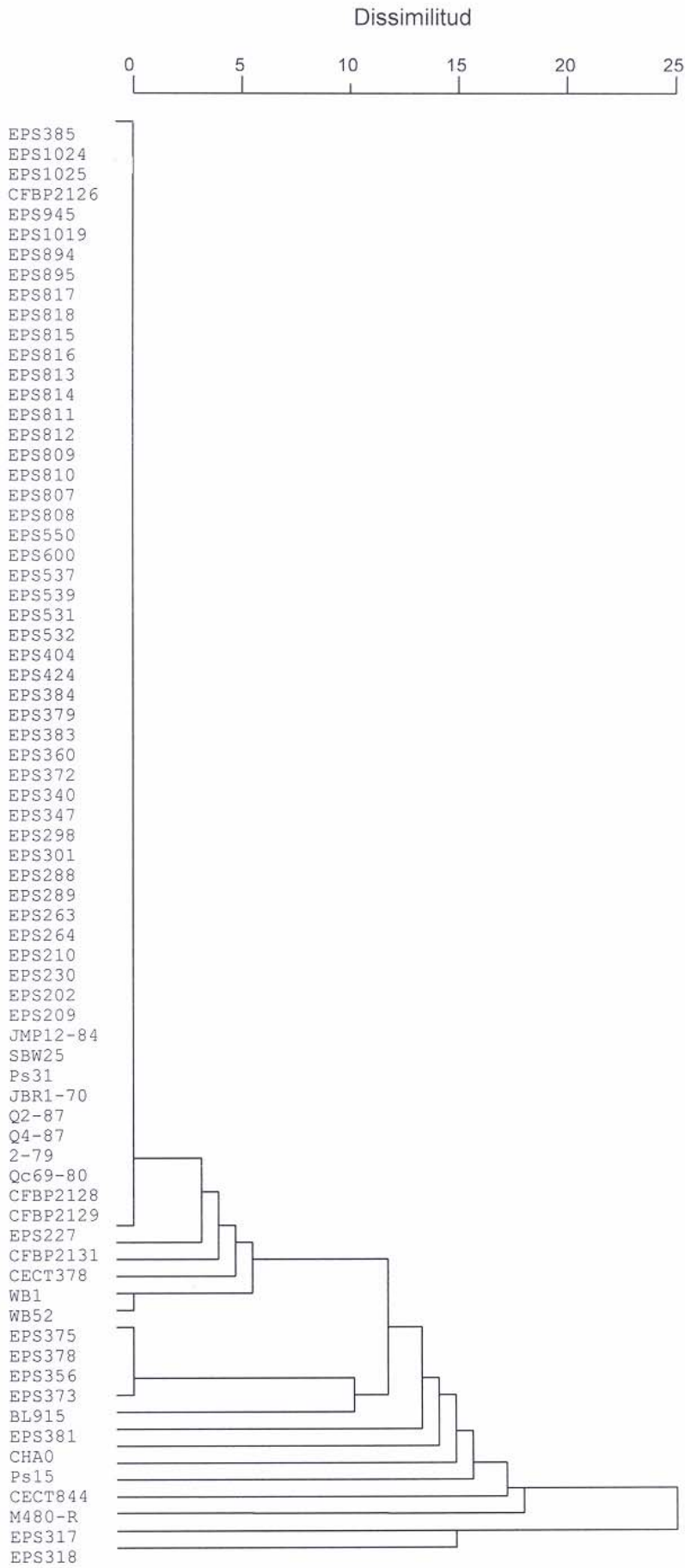




C



D



Les agrupacions obtingudes de les digestions amb els enzims *Hae* III, *Taq* I, *Nde* II i *Rsa* I per separat van permetre reconèixer 19 (*Hae* III), 14 (*Taq* I), 11 (*Nde* II) i 14 (*Rsa* I) patrons de restricció diferents.

A la taula 4.9 es mostren les freqüències de cada un dels patrons considerats i a la taula 4.10 es mostra el patró assignat a cada soca per a cada enzim, la identificació numèrica que es va assignar a cada patró va tenir en compte l'ordenació vertical obtinguda en el dendrograma corresponent. Es van considerar patrons diferents quan la similitud era inferior al 100 %.

En la major part de les soques, la suma de les mides dels fragments de restricció va ser inferior a la mida de l'amplificat sense digerir. En alguns casos però es va observar que la suma era superior a la de l'amplificat, possiblement com a resultat de l'heterogeneïtat de seqüència entre diferents còpies de l'operó. Les 4 soques (EPS356, EPS373, EPS375 i EPS378) que van presentar dos fragments d'amplificació van mostrar amb tots quatre enzims que a més de tenir 2 ITS de diferents mides, el gen 16S rDNA presentava heterogeneïtat de seqüència, atès que la suma dels fragments de restricció era superior a 4000 pb i per tant implicava que la seqüència del 16S rDNA també havia de ser diferent.

Taula 4.9 Freqüència de soques assignades a cada un dels patrons obtinguts amb les restriccions emprant per separat els enzims *Hae* III, *Taq* I, *Nde* II i *Rsa* I en el conjunt de les 72 soques.

Table 4.9 Restriction pattern frequencies obtained after separate restrictions with *Hae* III, *Taq* I, *Nde* II i *Rsa* I of the 72 strains used.

Patro nº	Enzim			
	<i>Hae</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Nde</i> II	<i>Taq</i> I
1	18	55	18	18
2	2	1	9	3
3	3	1	5	2
4	22	1	2	2
5	1	2	17	3
6	1	4	1	3
7	1	1	4	28
8	2	1	2	1
9	3	1	3	3
10	1	1	1	2
11	1	1	10	1
12	4	1	-	1
13	2	1	-	1
14	1	1	-	4
15	1	-	-	-
16	1	-	-	-
17	1	-	-	-
18	3	-	-	-
19	4	-	-	-

Taula 4.10 Patrons individuals i patró combinat resultants de restriccions amb 4 enzims dels amplificats per PCR (rDNA). Els patrons de restricció idèntics en cada cas es designen amb el mateix número.

Table 4.10 Individual and composite 16S rDNA patterns of PCR amplified products determined by restriction analysis with 4 enzymes. Equal restriction patterns in each cases are designated with the same number.

	<i>Hae</i> III	<i>Taq</i> I	<i>Nde</i> II	<i>Rsa</i> I	Combinat
<i>P. fluorescens</i> CECP378	8	7	11	4	24
<i>P. put</i> <i>Ida</i> CECP844	16	6	11	11	33
<i>P. fluorescens</i> CFBP2126	13	10	3	1	31
<i>P. fluorescens</i> CFBP2128	4	7	2	1	13
<i>P. fluorescens</i> CFBP2129	13	10	3	1	31
<i>P. fluorescens</i> CFBP2131	4	7	11	3	23
<i>P. fluorescens</i> 2-79	12	7	5	1	29
<i>P. fluorescens</i> M ₄ 80-R	8	13	5	12	32
<i>P. fluorescens</i> Q69c-80	2	1	1	1	2
<i>P. fluorescens</i> Q ₂ -87	1	2	2	1	4
<i>P. fluorescens</i> Q ₄ - 97	1	2	2	1	4
<i>P. fluorescens</i> CHA0	18	11	9	9	35
<i>P. fluorescens</i> Ps15	3	7	1	10	27
<i>P. fluorescens</i> Ps31	4	7	11	1	21
<i>P. fluorescens</i> WB1	18	9	9	5	34
<i>P. fluorescens</i> WB52	18	9	9	5	34
<i>P. fluorescens</i> BL915	14	9	5	7	38
<i>P. fluorescens</i> JBR1-70	3	1	11	1	26
<i>P. fluorescens</i> JMP12-84	4	1	1	1	3
<i>P. fluorescens</i> SBW25	4	7	5	1	12
<i>P. fluorescens</i> EPS202	4	6	11	1	25
<i>P. fluorescens</i> EPS209	12	4	8	1	28
<i>P. fluorescens</i> EPS210	12	4	8	1	28
<i>P. fluorescens</i> EPS227	4	7	11	2	22
<i>P. fluorescens</i> EPS230	1	3	5	1	5
<i>P. fluorescens</i> EPS263	1	2	2	1	4
<i>P. fluorescens</i> EPS264	4	7	3	1	11
<i>P. fluorescens</i> EPS288	11	3	5	1	6
<i>P. fluorescens</i> EPS289	12	5	4	1	30
<i>P. fluorescens</i> EPS298	4	7	5	1	12
<i>P. fluorescens</i> EPS301	10	7	5	1	16
<i>P. fluorescens</i> EPS317	17	12	10	13	36
<i>P. putida</i> EPS318	15	5	5	14	37
<i>P. fluorescens</i> EPS340	4	7	3	1	11
<i>P. fluorescens</i> EPS347	4	7	2	1	13
<i>P. fluorescens</i> EPS356	19	14	7	6	39
<i>P. fluorescens</i> EPS360	6	7	2	1	14
<i>P. fluorescens</i> EPS372	4	7	2	1	12
<i>P. fluorescens</i> EPS373	19	14	7	6	39
<i>P. fluorescens</i> EPS375	19	14	7	6	39
<i>P. fluorescens</i> EPS378	19	14	7	6	39
<i>P. fluorescens</i> EPS379	4	7	5	1	12
<i>P. fluorescens</i> EPS381	4	7	5	8	17
<i>P. fluorescens</i> EPS383	4	7	5	1	12
<i>P. fluorescens</i> EPS384	7	7	2	1	15
<i>P. fluorescens</i> EPS385	5	5	5	1	7
<i>P. fluorescens</i> EPS404	4	6	3	1	8
<i>P. fluorescens</i> EPS424	4	7	2	1	12
<i>P. fluorescens</i> EPS531	4	7	11	1	21
<i>P. fluorescens</i> EPS532	9	7	5	1	20
<i>P. fluorescens</i> EPS537	9	7	11	1	19
<i>P. fluorescens</i> EPS539	9	7	11	1	19
<i>P. fluorescens</i> EPS550	4	7	5	1	12
<i>P. fluorescens</i> EPS600	4	7	5	1	12
<i>P. fluorescens</i> EPS807	1	1	1	1	12
<i>P. fluorescens</i> EPS808	2	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS809	1	1	1	1	2
<i>P. fluorescens</i> EPS810	1	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS811	1	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS812	1	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS813	1	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS814	1	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS815	1	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS816	1	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS817	1	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS818	1	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS894	3	7	4	1	9

Taula 4.10 Continuació
Table 4.10 Continuation

	<i>Hae</i> III	<i>Taq</i> I	<i>Nde</i> II	<i>Rsa</i> I	Combinat
<i>P. fluorescens</i> EPS895	4	8	6	1	8
<i>P. fluorescens</i> EPS945	4	7	4	1	11
<i>P. fluorescens</i> EPS1019	2	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS1024	2	1	1	1	1
<i>P. fluorescens</i> EPS1025	2	1	1	1	1
PATRONS DIFERENTS	19	14	11	14	39

Com es pot observar a la taula 4.9 va ser amb l'enzim *Rsa*I amb el que es van obtenir més soques pertanyents a un mateix patró (l'1), mentre que la resta de soques mostren majoritàriament un patró diferencial. La màxima dissimilitud amb el coeficient de Dice va correspondre a 0.833 (els valors obtinguts es mostren en l'annex 4) entre *P. putida* EPS318 i el conjunt de les 4 soques EPS356, EPS373, EPS375 i EPS378 (al presentar aquest grup un alt nombre de fragments).

Amb els enzims *Nde* II, *Hae* III i *Taq* I es van observar en tots tres casos 2 patrons majoritaris (l'1 i el 5 amb *Nde* II, l'1 i el 4 amb *Hae* III i l'1 i el 7 amb *Taq* I), que corresponen al 48,6 % (*Nde* II), 55,5 % (*Hae* III) i 63,8 % (*Taq* I) de la totalitat de les soques. Les màximes dissimilituds assolides amb el coeficient de Dice van ser 0.6927 (*Taq*I), 0.778 (*Nde* II) i 0.765 (*Hae* III) (Annex 4).

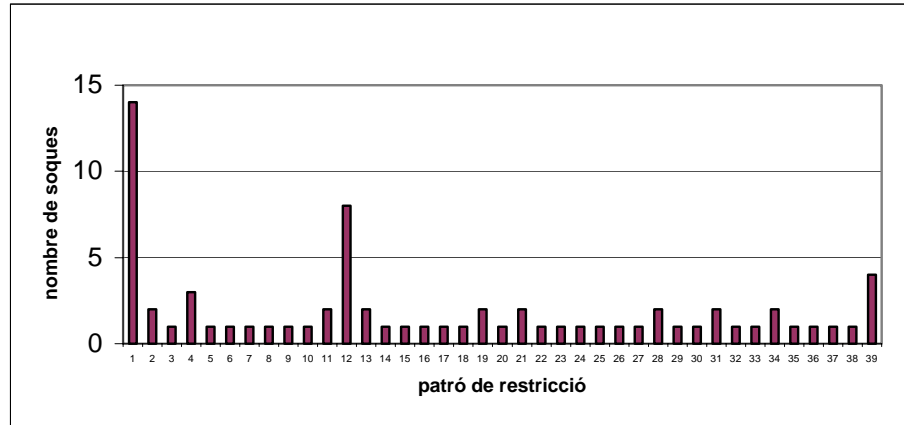
En tots 4 dendrogrames les dues soques classificades en el capítol anterior com a *P. putida* (CECT844 i EPS318) van quedar intercalades entre la resta de soques i tampoc es va observar cap relació entre les agrupacions obtingudes i els diferents biovars de *P. fluorescens*.

Els patrons obtinguts per a cada una de les soques amb el conjunt dels quatre enzims (Taula 4.10) es van combinar per construir un nou dendrograma. A la figura 4.11 es mostra la freqüència de cada un dels patrons. En total es van definir 39 patrons de restricció diferents fruit de les diverses combinacions dels patrons individuals amb els 4 enzims (l'assignació de numeració en els patrons es va realitzar de la mateixa manera que pels patrons de cada enzim). El resultat conjunt provoca una major discriminació entre les soques i llevat de dos dels patrons (l'1 i el 12 que contenen 14 i 8 soques respectivament) els altres grups estan formats per 1 o poques soques (Taula 4.10 i Figura 4.11)

El dendrograma obtingut (Figura 4.12) presenta l'aspecte més d'un arbust que d'un arbre i la màxima dissimilitud entre dos patrons es de 0.607. A un nivell de similitud superior al 70% s'agrupen 53 de les 72 soques formant diverses agrupacions internes però força allunyades de la resta de soques. En el dendrograma combinat amb l'ús dels 4 enzims es continua mantenint de manera consistent que el grup format per WB1, WB52, CHA0, EPS317, BL915, EPS356, EPS373, EPS375 i EPS378 estan allunyades de la resta de soques. Cal fer esment que la majoria del conjunt de soques estudiades que van ser aïllades en el nostre treball formen part de la mateixa agrupació en el dendrograma.

Figura 4.11 Freqüència dels patrons obtinguts amb les combinacions de les restriccions dels enzims *Hae* III, *Taq* I, *Nde* II i *Rsa* I en el conjunt de les 72 soques.

Figure 4.11 Restriction pattern frequencies obtained after combining restrictions with *Hae* III, *Taq* I, *Nde* II i *Rsa* I of the 72 strains used.

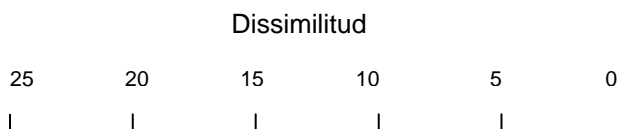


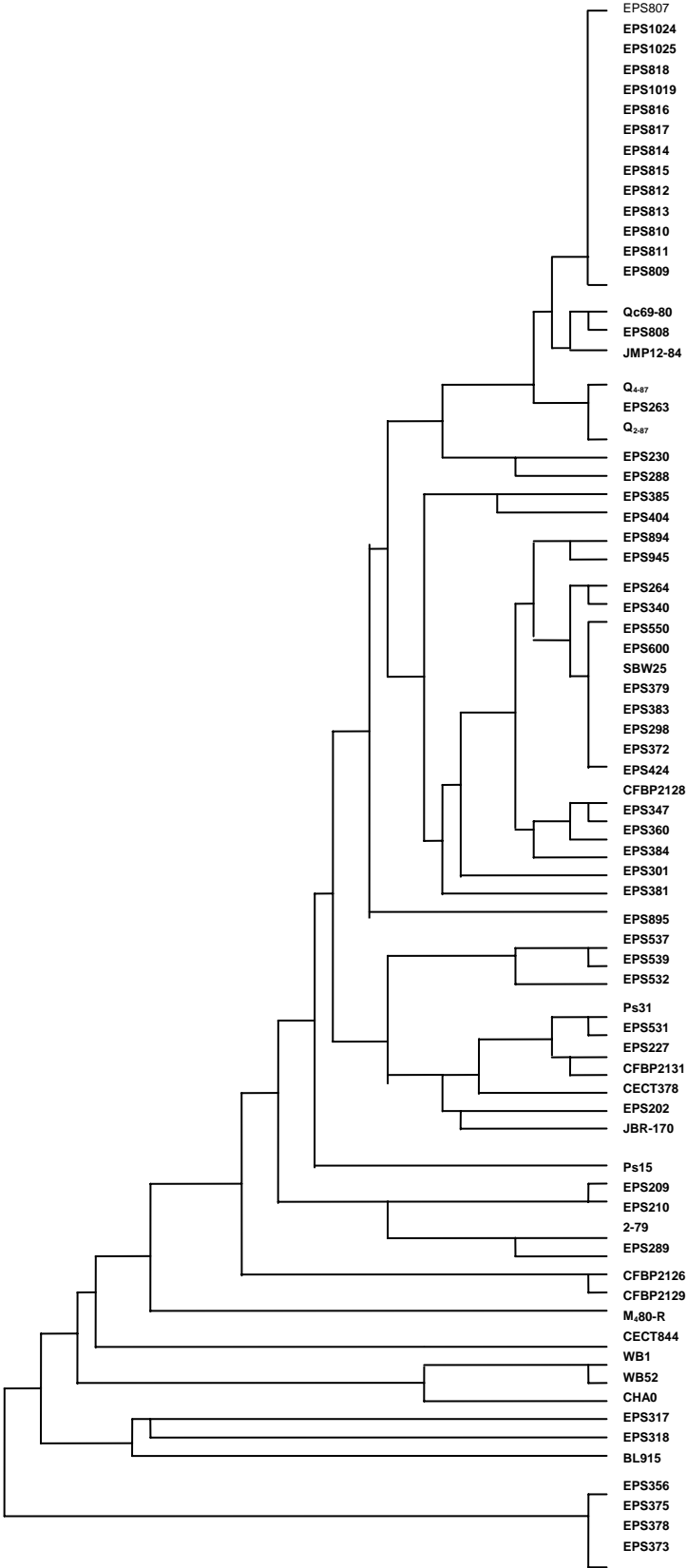
En conclusió, els resultats obtinguts mostren una gran heterogeneïtat genotípica a nivell del fragment de l'operó ribosomal analitzat. No s'observa cap relació entre les agrupacions obtingudes i el biovar, la producció d'un determinat metabòlit, la seva capacitat de promoció de creixement en portaampelts de perera ni l'activitat de biocontrol.

Pàgina següent/Next page

Figura 4.12 Dendrograma de l'agrupació de les soques segons el patró de restricció dels amplificats 16SrDNA+ITS amb els resultats dels enzims *Hae* III (A), *Taq* I (B), *Nde* II (C) i *Rsa* I (D) emprant el coeficient de Dice. L'escala que es mostra és reescalada.

Figure 4.12 Dice cluster analysis of composite *Hae* III (A), *Taq* I (B), *Nde* II (C) and *Rsa* I (D) restriction patterns of amplified 16S rDNA + ITS of *Pseudomonas* strains used in this study. Escala bar is a reescaled distance.





4.3.2 Anàlisi dels fragments de macrorestricció genòmica generats amb l'ús d'enzims de restricció de tall poc freqüent i separats amb electroforesi en camp polsant

Inicialment es van provar dos protocols de lisi cel·lular, el protocol 1 descrit per a *Escherichia coli* (Smith i col. 1988), que ha donat bons resultats en molts bacteris Gram negatius, i el protocol 2 descrit per a membres del gènere *Pseudomonas* (Römling i Tümmler 1991) que han estat descrits a l'apartat de Material i Mètodes. Les diferències entre els dos protocols rauen en les solucions emprades per aconseguir la lisi cel·lular i en la durada de les diferents passes. Quant a la neteja dels *inserts* es va portar a terme de dues maneres, amb la realització d'una precarrera amb els *inserts* procedents del protocol 1, i amb el rentat dels *inserts* en els procedents del protocol 2.

En el protocol 1, la lisi cel·lular es provoca en dues passes i té una durada aproximada d'uns tres dies. La posterior neteja de les restes cel·lulars de l'interior dels *inserts* s'aconsegueix amb la realització d'una electroforesi preparativa (anomenada precarrera) i cal un dia i mig per a realitzar-la. Des de la preparació de l'*insert* a la digestió per les endonucleases, calen de 4 a 5 dies. En el protocol 2 solament s'empra una solució de lisi i té una durada aproximada d'un dia, necessitant només un altre dia per a la neteja de les restes cel·lulars dels *inserts*. Si bé la neteja dels *inserts* que vam associar al protocol 1 representa una inversió de temps més gran i es més laboriosa, era un mètode interessant de provar donat que s'aconsegueix posar de manifest el material extracromosòmic de mida inferior a 1 Mb. D'altra banda, la neteja dels *inserts* que vam associar al protocol 2 permet obtenir el DNA total cel·lular preparat per a la digestió en un temps molt més curt.

El resultat amb el protocol 1, tant amb la utilització de pronasa com de proteïnasa K per a la lisi cel·lular i posterior neteja dels *inserts* mitjançant la realització d'una precarrera electroforètica, no va ser satisfactori tal com mostra la figura 4.15 on s'observa una gran quantitat de DNA cromosòmic degradat en el gel. Amb la posterior digestió d'aquests *inserts* no es van obtenir fragments de macrorestricció genòmica, alhora que es va observar que en la tinció del gel no es dipositava bromur d'etidi en l'*insert*. Aquest resultat va ser probablement degut a que la totalitat del DNA cromosòmic es degradava durant el perllongat temps que durava la precarrera, possiblement degut a l'acció d'endonucleases del mateix bacteri.

Amb l'ús del protocol 2 i la neteja dels *inserts* mitjançant rentats amb tampó TE es van obtenir bons resultats i un temps considerablement més reduït que amb l'anterior protocol, escollint-se aquesta metodologia per a la realització de la resta del treball.

En tots els protocols descrits per PFGE, la preparació dels *inserts* es realitza majoritàriament amb un cultiu bacterià en fase exponencial. En el nostre treball es van obtenir els mateixos resultats

quan el cultiu estava en fase exponencial que ja entrat en fase estacionària i per aquest motiu, es van emprar cultius de nit.

Per a l'obtenció dels patrons de macrorestricció genòmica per PFGE es van provar els enzims de restricció de tall poc freqüent, *Xba* I, *Nhe* I, *Dra* I, *Spe* I i *Swa* I en tres soques de *P. fluorescens*. Al mateix temps, van estudiar-se diverses condicions d'electroforesi per trobar les que permetessin resoldre una part important del genoma en un mateix gel.

La digestió del DNA inclòs en els *inserts* amb els enzims *Xba* I i *Spe* I va produir un nombre excessiu de bandes que era difícil d'analitzar. Malgrat aquesta limitació, van proporcionar visualment i a grans trets una impressió de diferència, semblança o igualtat entre els patrons de les diferents soques. Amb els enzims *Nhe* I i *Dra* I sota les condicions provades no es va obtenir una bona resolució dels fragments o bé no es van obtenir fragments. A la figura 4.16 poden observar-se els patrons de macrorestricció resultants de les digestions amb aquests enzims.

L'enzim *Swa* I va generar un nombre de bandes fàcilment analitzable. A partir dels resultats observats amb aquest enzim sota diferents condicions d'electroforesi, va escollir-se una finestra que permetia analitzar de 6 a 16 fragments de macrorestricció per soca, les mides dels quals oscil·laven de 48 a 680 Kb, aplicant una rampa de temps de 5 a 50 s en l'electroforesi. Tal com s'especifica en l'apartat de material i mètodes, aquest rang de mides va dividir-se en 49 intervals. Excepcionalment una soca, la 317, va presentar una única banda. En determinades soques van observar-se clarament bandes dobles en alguns dels patrons, i van considerar-se dobles quan la banda era molt més intensa respecte a la resta del patró.

Pàgina següent/Next page

Figura 4.13 Representació esquemàtica dels patrons de macrorestricció genòmica obtinguts amb l'enzim *Swa* I per a cada una de les 72 soques emprades. Les bandes més intenses corresponen a bandes considerades dobles.

Figure 4.13 Schematic representation of genomic macrorestriction patterns obtained from *Swa* I restriction enzyme for each strain. Intense bands correspond to considered double bands.

En conjunt, es van observar 54 patrons de macrorestricció genòmica diferents entre les 72 soques estudiades. A la figura 4.13 es mostra una representació esquemàtica dels patrons de macrorestricció genòmica obtinguts. i en les figures 5.14 a 5.24 en mostren els gels.

La mida genòmica mitjana de *P. fluorescens* està al voltant de 6 Mb segons es desprèn dels resultats obtinguts en *P. fluorescens* CECT378 (Grothues i Tümmler 1991) i *P. fluorescens* SBW25 (Rainey i Bailey 1996). En conseqüència, pel conjunt de soques, el percentatge del genoma analitzat en el nostre treball és del 70 al 80 % en 5 soques, del 60 al 70 % en 6, del 50 al 60 % en 31, del 40 al 50 % en 18, del 30 al 40 % en 9 i menys d'un 30 % en 3 soques.

En una primera inspecció visual, va observar-se que hi havia 7 patrons de macrorestricció compartits per més d'una soca. El primer dels patrons compartit per més soques, 10 en total, corresponia a una part dels aïllats del nostre treball (EPS808 a EPS811, EPS813 a EPS816, i EPS1024 -EPS1025). Els segon patró més compartit ho va ser per 4 soques (EPS356-EPS378-EPS373-EPS375) i 6 patrons eren compartits solament per dues soques (EPS537-EPS539; EPS209-EPS210; EPS807-EPS818; Q₂₋₈₇-Q₄₋₈₇; WB1-WB52; CFBP2126-CFBP2129). En aquests casos es va procedir a la realització d'una nova electroforesi en el mateix gel de les soques corresponents al mateix patró a més de realitzar noves digestions amb l'enzim *Xba*I. (Figures 4.17,4.18, 4.20, 4.22 i 4.23).

En el cas del primer patró, compartit per moltes soques, és raonable assumir que els diferents aïllats corresponen a la mateixa soca donat que la procedència era la mateixa (viver d'Agromillora Catalana), malgrat procedir de diferents mostres. Tanmateix, la tècnica permet distingir entre tots els aïllats seleccionats d'aquella procedència i amb la característica comú de ser productores de floroglucinol, 4 patrons diferents del total de 20 aïllats i amb un patró dominant en 16 d'ells, indicant que hi havia una soca predominant en nombre respecte la resta. En el cas d'EPS807 i EPS818, també procedien del mateix lloc però de diferents mostres i corresponen a un dels patrons compartits per dues soques citats anteriorment. Pel que fa referència al segon patró predominant de les soques *P. fluorescens* EPS356-EPS378-EPS373-EPS375 i a les soques EPS537-EPS539 així com les EPS209-EPS210, en cada un dels diferents grups les soques provenien del mateix lloc i de la mateixa mostra. En les restriccions posteriors dels *inserts* amb l'enzim *Xba*I, es van observar els mateixos patrons de restricció per les soques de cada un dels grups en les condicions assajades (Figures 4.22 i 4.23).

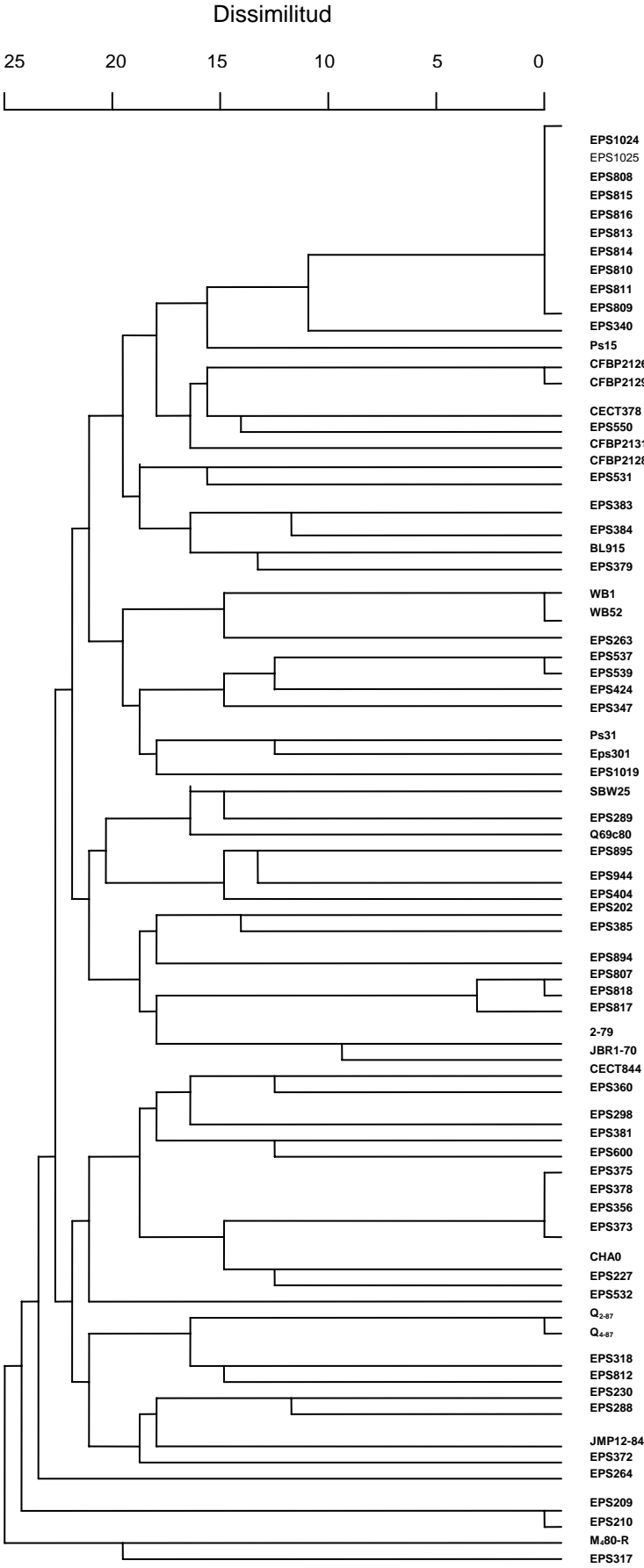
Entre les soques de referència procedents de col·leccions de cultius, les soques CFBP2126 i CFBP2129 van mostrar el mateix patró de macrorestricció genòmica (Fig. 4.23) quan l'enzim utilitzat era *Swa*I i *Xba*I. El mateix succeeix en els altres grups de soques, cedides per altres investigadors (WB1 i WB52 i Q₂₋₈₇ i Q₄₋₈₇) en les que les noves digestions continuaven mostrant el mateix patró de restricció. En ambdós casos, la procedència de cada parella de soques era la mateixa i pel que fa a *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ i Q₄₋₈₇ es tractava de soques aïllades en el mateix lloc en

diferents períodes. A part d'aquests patrons de macrorestricció compartits, la resta de patrons van mostrar ser específics per a cada soca. En conjunt, el nivell de similitud obtingut va ser molt baix, tal com es mostra en el dendrograma de la figura 4.14. A l'igual que en el dendrograma obtingut amb l'anàlisi RFLP-PCR-rDNA no es va observar cap relació entre les agrupacions obtingudes i altres característiques fenotípiques. En conjunt, la tècnica va mostrar ser discriminatòria a nivell de soca, de manera que amb l'observació del patró de restricció es podia identificar la soca que s'estava analitzant.

Pàgina següent/Next page

Figura 4.14 Dendrograma de l'agrupació de les soques segons els patrons de macrorestricció genòmica generats amb l'enzim *Swa* I emprant el coeficient de Dice. L'escala que es mostra està reescalada.

Figure 4.14 Dice cluster analysis of macrorestriction patterns with *Swa* I of *Pseudomonas* strains used in this study. Escala bar is a reescaled distance.



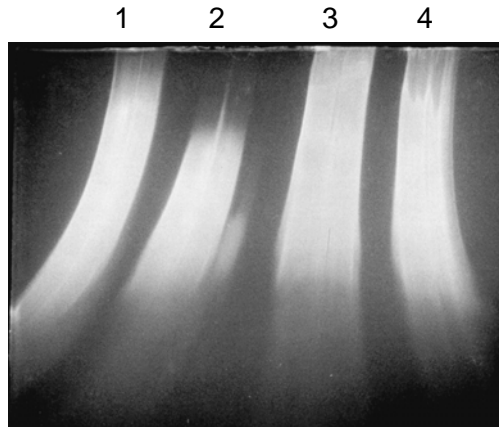


Figura 4.15 DNA cromosòmic degradat com a resultat de la precarrera de rentat dels *inserts* de *P. fluorescens* EPS288, seguint el protocol 1 (Smith i col. 1987). Línies: diferents concentracions de de cèl·lules lisades amb ESP+proteïnasa K (1 i 2) i ESP+pronasa (3 i 4). Electroforesi OFAGE amb polsos de 125 s durant 36 h a 330 V.

Figure 4.15 Chromosomal DNA was degraded as a result preelectrophoresis of *inserts* of *P. fluorescens* EPS288 using protocol 1 (Smith et al.1987).Lanes: different DNA concentration from lysed cells with ESP+proteinase K (1,2) and ESP+pronase (3,4). OFAGE electrophoresis , pulse time of 125 s for 36 h at 330 V.

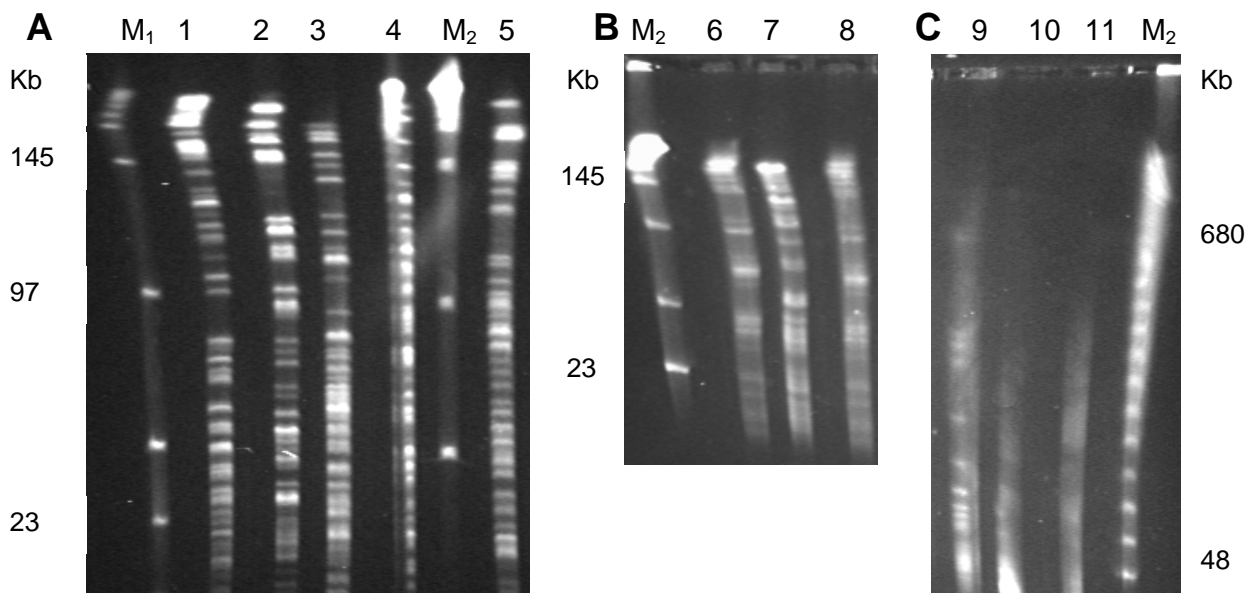


Figura 4.16 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de soques de *P. fluorescens* segons el tipus d'enzim utilitzat. **A**, *Xba* I (CHEF, polsos de 5 s durant 21h a 250 V); **B**, *Spel*; (CHEF, polsos de 8 s durant 21h a 250 V) **C**, *Nhe* I i *Dra* I (CHEF, rampes de 5 a 50 s durant 21h i 250 V).

Figure 4.16 Patterns of macrorestriction fragments of genomic DNA of *P. fluorescens* strains digested with different enzymes: **A**, *Xba* I (CHEF, pulse time of 5 s for 21h at 250 V); **B**, *Spel*; (CHEF, pulse time of 8 s during 21h at 250 V) **C**, *Nhe* I and *Dra* I (CHEF, pulse time increasing linearly from 5 to 50 s during 21h at 250 V).

Línies/Lanes

CECT378 (1), CECT844 (2), CECT2128 (3), CECT2131 (4), EPS288 (5), EPS356 (6), EPS372 (7) i EPS373 (8), EPS209 (9) EPS209 (10) i EPS288 (11) M₁, lambda ladder. M₂, Low range ladder.

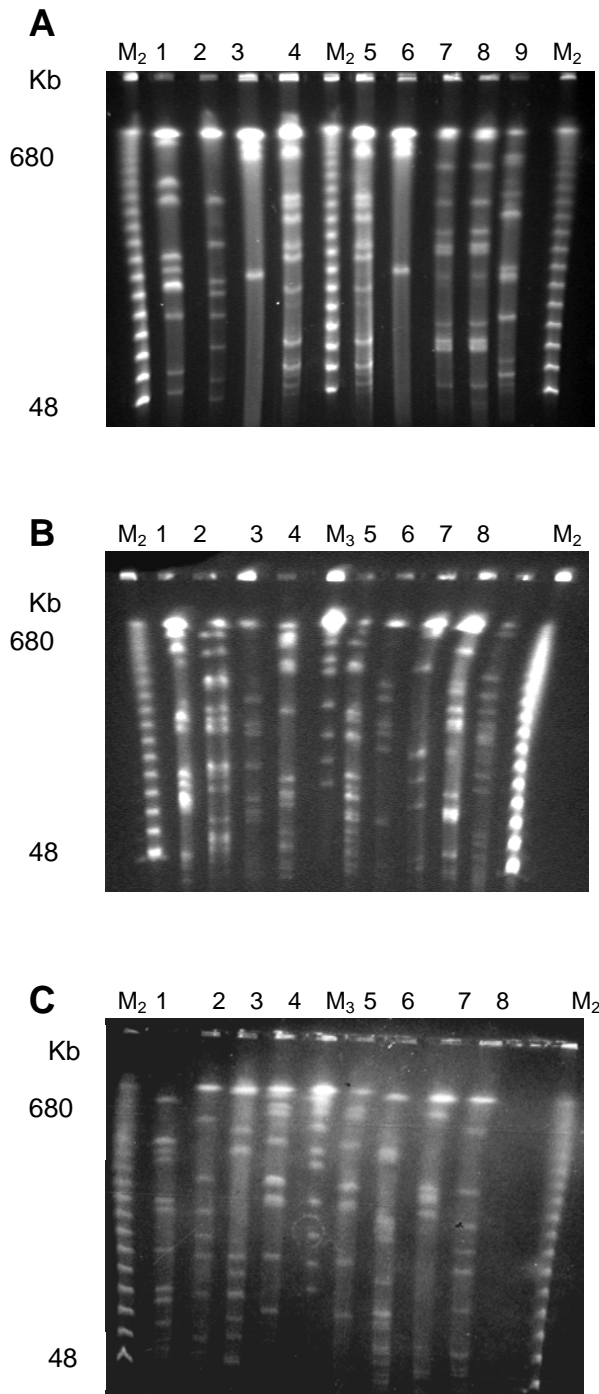


Figura 4.17 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de soques de *P. fluorescens* digerit amb l'enzim *Swa* i separats per CHEF amb rampes de 5 a 50 s durant 21h a 250 V.

Figure 4.17 Patterns of macrorestriction fragments of genomic DNA of *P. fluorescens* strains digested with *Swa* I enzyme. CHEF electrophoresis with a pulse time increasing linearly from 5 to 50 s during 21h at 250 V.

A, Ps31(1), CHA0 (2), EPS317 (3), WB1 (4), WB52 (5), EPS317 (6), EPS288 rif⁺ (7), EPS288 (8), Ps15 (9). **B**, EPS298 (1), EPS600 (2), EPS289 (3), EPS340 (4), EPS379 (5), EPS318 (6), EPS532 (7), EPS230 (8). **C**, EPS381 (1), EPS263 (2), EPS539 (3), EPS210 (4), EPS209 (5), EPS384 (6), EPS264 (7), EPS263 (8). M₃, *Saccharomyces cerevisiae*. M₂, lambda.ladder

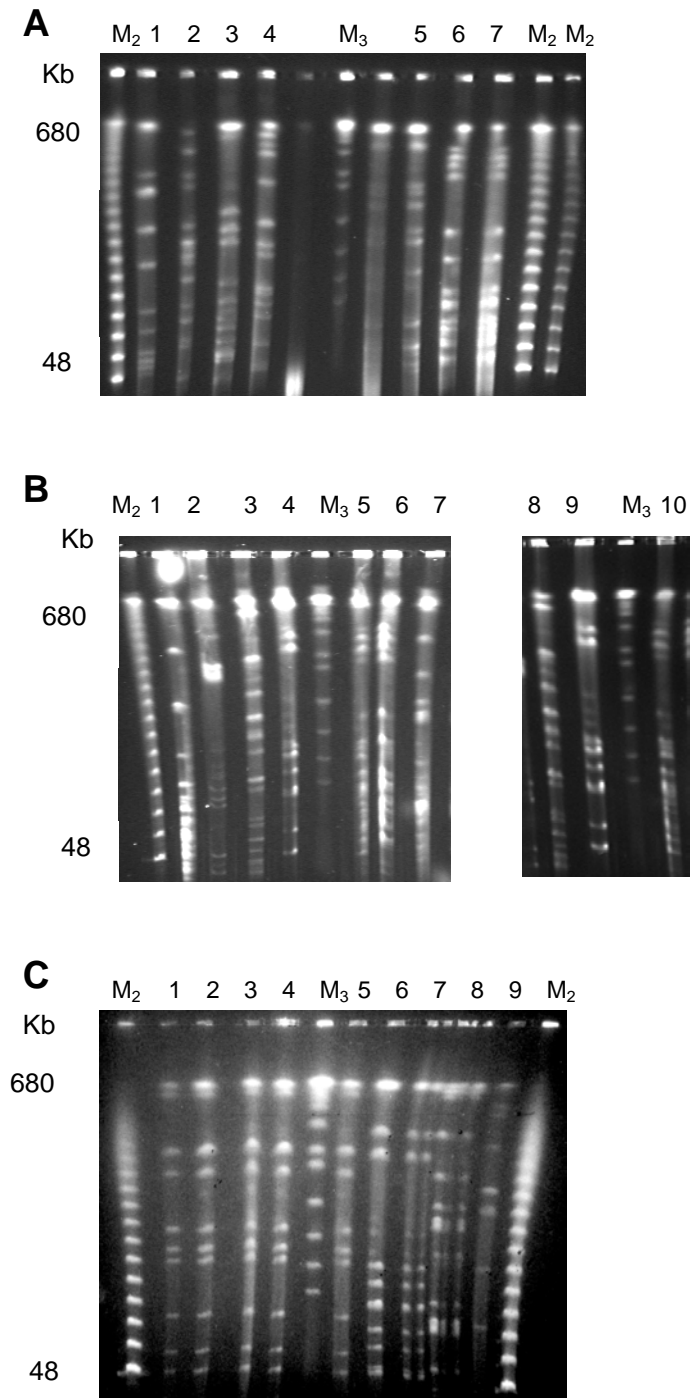


Figura 4.19 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de soques de *P. fluorescens* digerit amb l'enzim *Swa* I i separats per CHEF amb rampes de 5 a 50 s durant 21h a 250 V.

Figure 4.19 Patterns of macrorestriction fragments of genomic DNA of *P. fluorescens* strains digested with *Swa* I enzyme. CHEF electrophoresis with a pulse time increasing linearly from 5 to 50 s during 21h at 250

A, JBR170 (1), JPM1284 (2), SBW25 (3), BL915 (4), WB52 (5), CFBP2129 (6) i CFBP2126 (7).

B, CECT378 (1), CECT844 (2), CFBP2128 (3), CFBP2131 (4), CFBP2126 (5), CFBP2129 (6), EPS288 (7), CFBP2128 (8), CFBP2131(9) i CFBP2126 (10).

C, EPS372 (1), EPS356 (2), EPS373 (3), EPS375 (4), EPS378 (5), EPS537 (6), EPS539 (7), EPS288 (8), EPS209 (9).

M₃, *Saccharomyces cerevisiae*. M₂, lambda.ladder

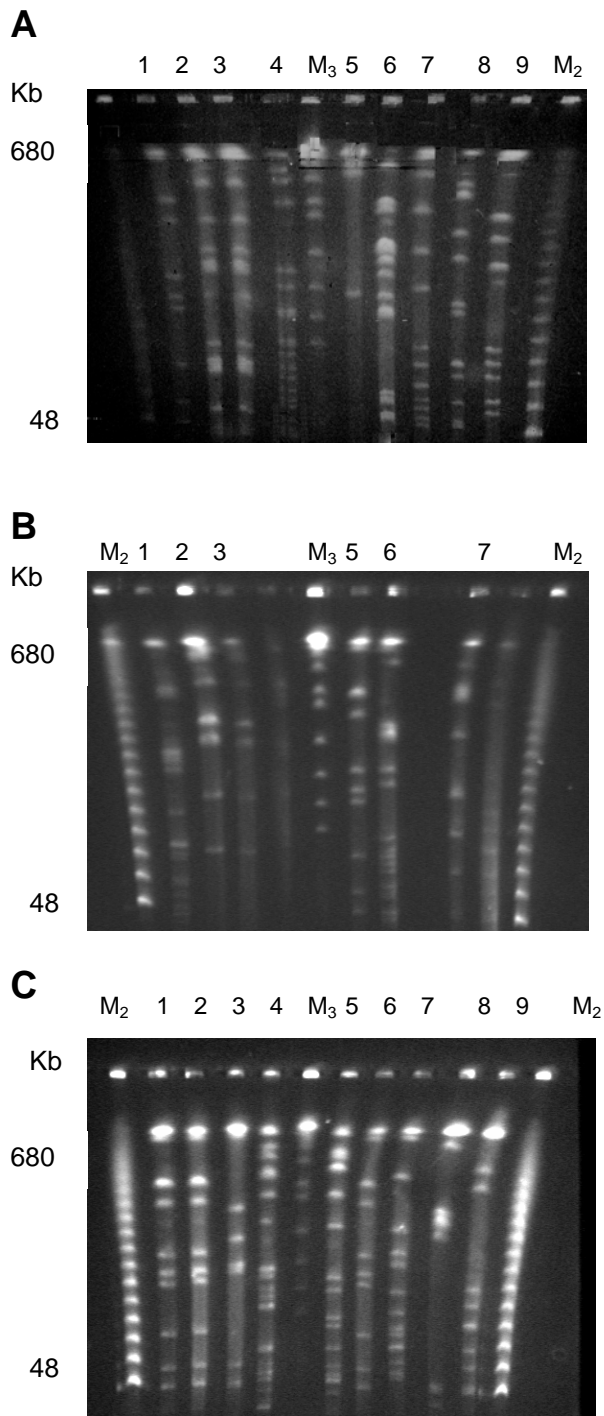


Figura 4.18 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de soques de *P. fluorescens* digerit amb l'enzim *Swa* I i separats per CHEF amb rampes de 5 a 50 s durant 21h a 250 V.

Figure 4.18 Patterns of macrorestriction fragments of genomic DNA of *P. fluorescens* strains digested with *Swa* I enzyme. CHEF electrophoresis with a pulse time increasing linearly from 5 to 50 s during 21h at 250

A, EPS372 (1), EPS288 (2), EPS288 rif⁺ (3), EPS550 (4), EPS317 (5), EPS301 (6), EPS202 (7), EPS360 (8), EPS404 (9).

B, EPS384 (1), EPS210 (2), EPS209 (3), EPS356 (5), EPS383 (6) i EPS531 (7).

C, EPS375 (1), EPS373 (2), EPS 227 (3), EPS424 (4), EPS 347 (5), EPS378 (6), EPS385 (7), EPS264 (8), EPS537 (9).

M₃, *Saccharomyces cerevisiae*. M₂, lambda.ladder

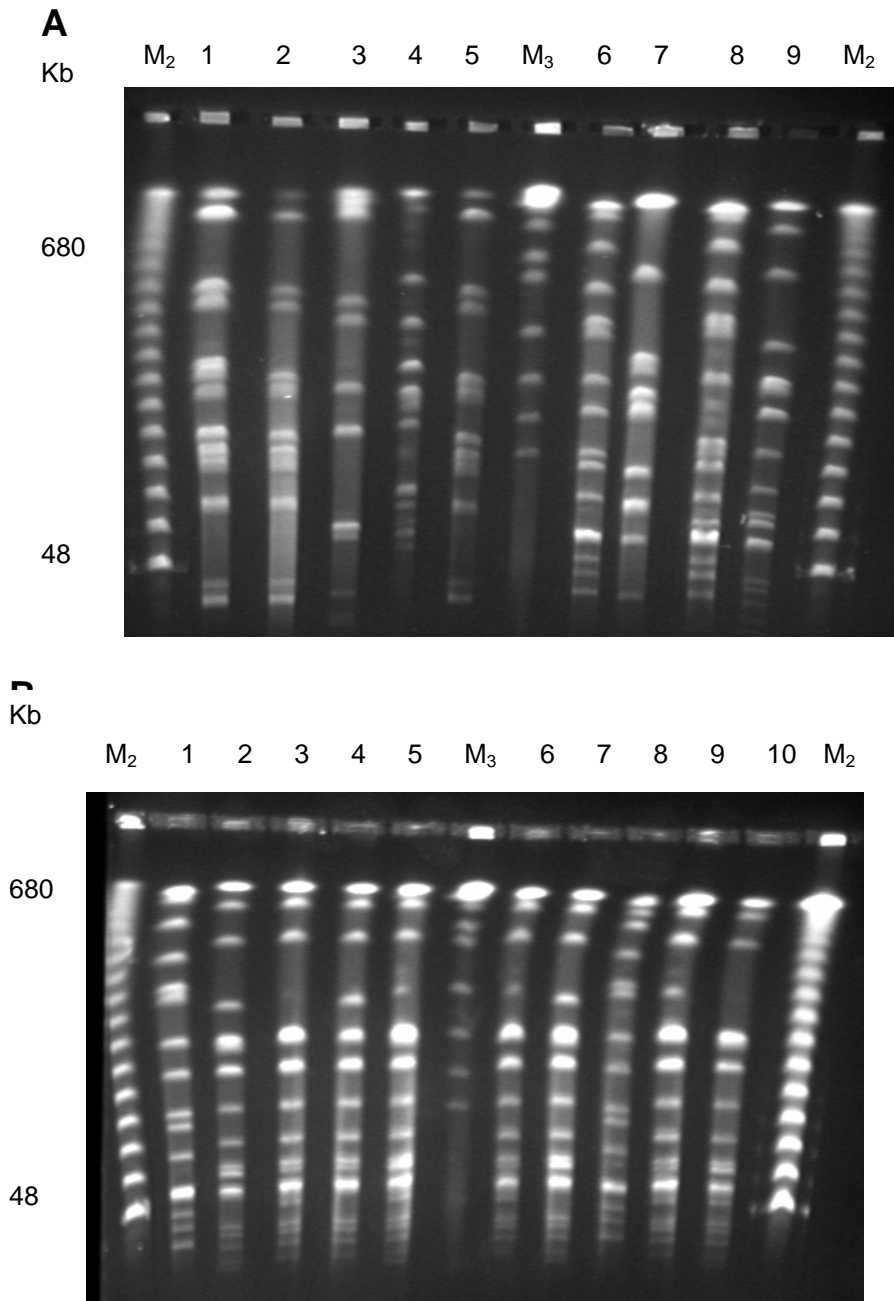


Figura 4.20 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de soques de *P. fluorescens* digerit amb l'enzim *Swa* I i separats per CHEF amb rampes de 5 a 50 s durant 21h a 250 V.

Figure 4.20 Patterns of macrorestriction fragments of genomic DNA of *P. fluorescens* strains digested with *Swa* I enzyme. CHEF electrophoresis with a pulse time increasing linearly from 5 to 50 s during 21h at 250

A, Q₂₋₈₇ (1), Q₄₋₈₇ (2), M4-80R (3), Qc6980 (4), Q₄₋₈₇ (5), EPS807 (6), EPS812, (7), EPS817 (8), EPS808 (9).

B, EPS807 (1), EPS808 (2), EPS809 (3), EPS810 (4), EPS813, (5) EPS814 (6), EPS816 (7), EPS818 (8), EPS815(9), EPS811 (10).

M₃, cromosomes de *Saccharomyces cerevisiae*. M₂, concatàmers del fag lambda.

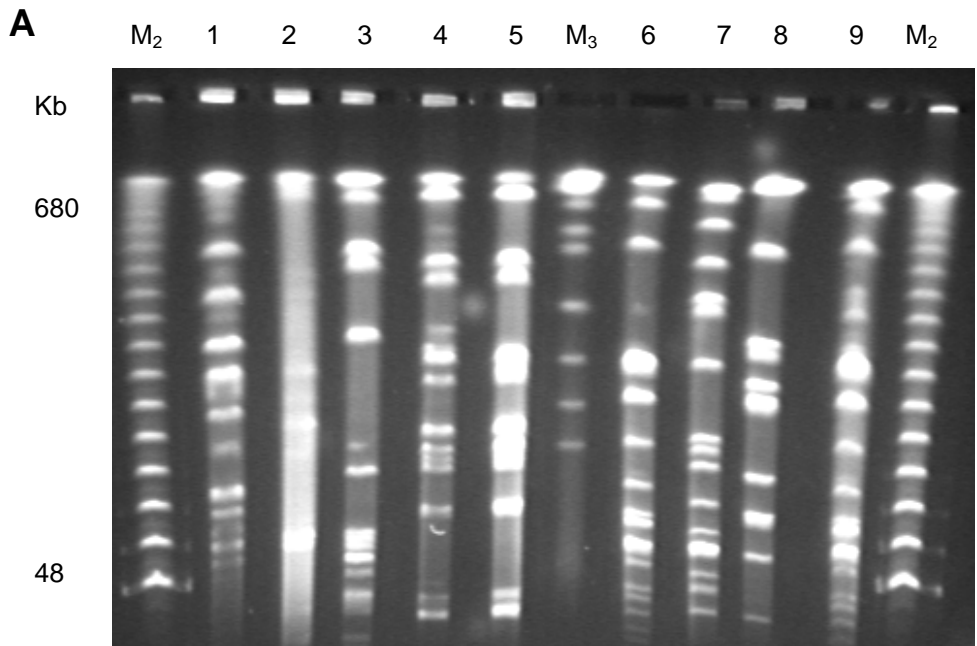


Figura 4.21 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de soques de *P. fluorescens* digerit amb l'enzim *Swa I* i separats per CHEF amb rampes de 5 a 50 s durant 21h a 250 V.

Figure 4.21 Patterns of macrorestriction fragments of genomic DNA of *P. fluorescens* strains digested with enzyme *Swa I*. CHEF electrophoresis with a pulse time increasing linearly from 5 to 50 s during 21h at 250

Qc6980 (1), M4-80R (2), Ps2-79 (3), Q₂₋₈₇ (4), Q₄₋₈₇ (5), EPS811 (6), EPS817 (7), EPS812 (8), EPS1024 (9).

M₃, cromosomes de *Saccharomyces cerevisiae*. M₂, concatàmers del fag lambda.

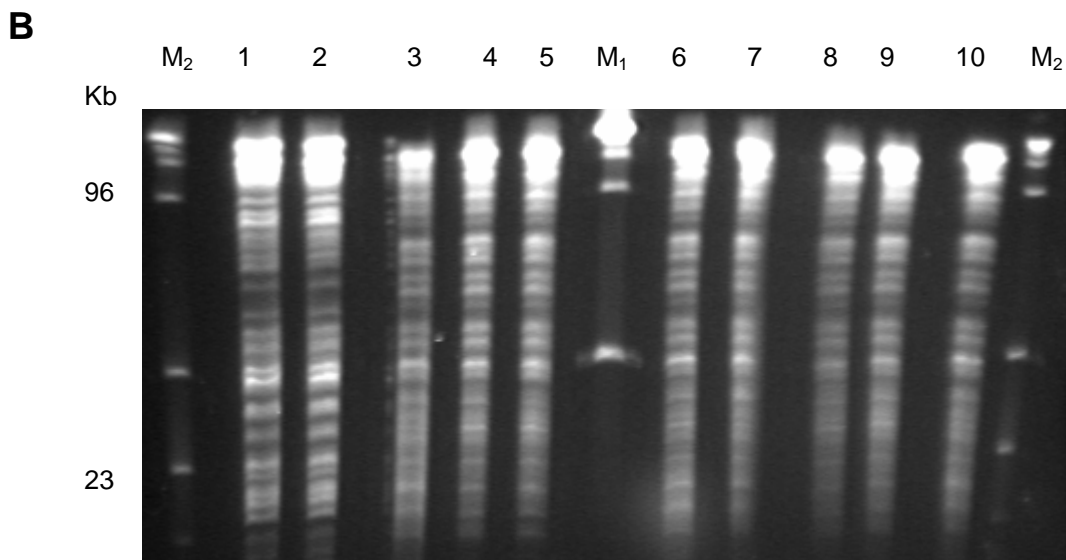


Figura 4.22 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de soques de *P. fluorescens* digerit amb l'enzim *Xba I* i separats per CHEF amb polsos constants de 5 s durant 21h a 250 V.

Figure 4.22 Patterns of macrorestriction patterns of genomic DNA of *P. fluorescens* strains digested with enzyme *Xba I*. CHEF, pulse time of 5 s during 21 h at 250 V.

Q₂₋₈₇ (1), Q₄₋₈₇ (2), EPS808 (3), EPS809 (4), EPS810 (5), EPS811(6), EPS813 (7), EPS814 (8), EPS815 (9), EPS816(10).

M₁, Low ringer ladder, M₂, Lambda ladder

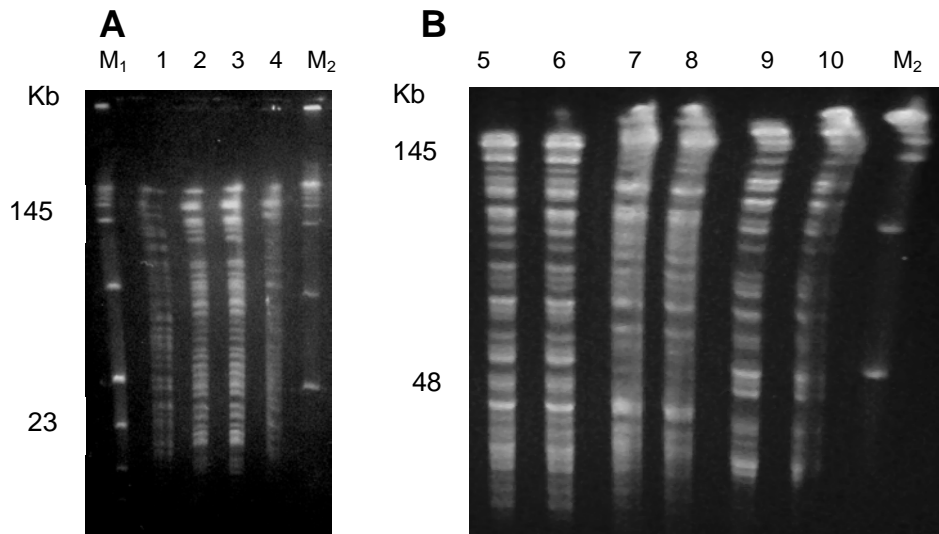


Figura 4.23 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de soques de *P. fluorescens* digerit amb l'enzim *Xba* I. CHEF amb polsos de 8 s durant 21h a 250 V.

Figure 4.23 Patterns of macrorestriction fragments of genomic DNA of *P. fluorescens* strains with restriction enzyme *Xba* I. CHEF, pulse time 5s from 21 h at 250 V.

A, EPS372 (1), EPS288 (2), EPS288 rif⁺ (3), EPS384 (4)
B, WB1(5), WB52 (6), CFBP2126 (7), CFBP2129 (8), EPS209 (9), EPS210 (10).
 M₁, Low ranger ladder, M₂, lambda ladder.

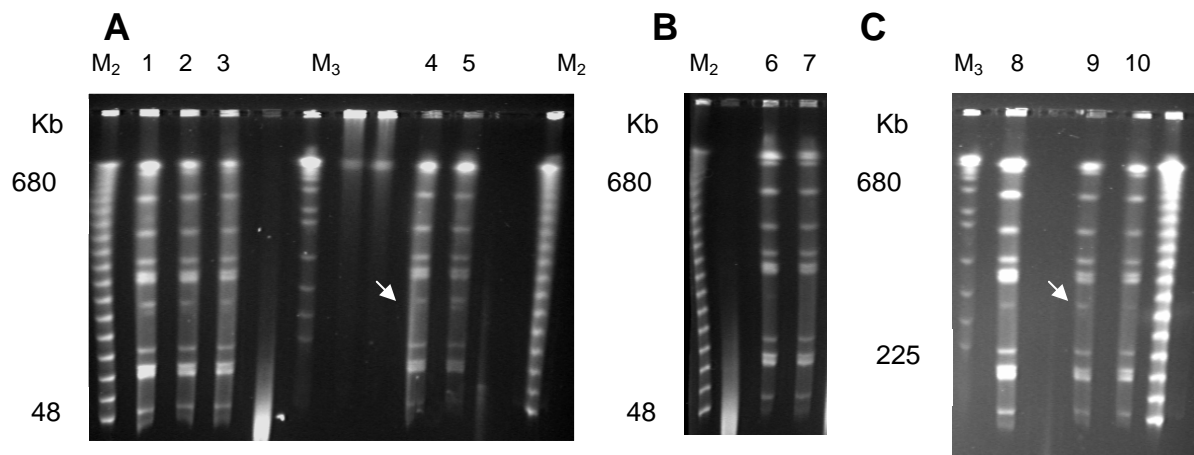


Figura 4.24 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de *P. fluorescens* EPS288 (sotmesa a diferents condicions de laboratori), digerit amb l'enzim *Swa* I i separats per CHEF amb rampes de 5 a 50 s durant 21h a 250 V.

Figure 4.24 Patterns of macrorestriction fragments of genomic DNA of *P. fluorescens* EPS288 (grown or maintained under different laboratory conditions), restricted with *Swa* I. CHEF electrophoresis with a pulse time increasing linearly from 5 to 50 s for 21 h at 250 V.

A, 6°C (1), 15°C (2), 25°C (3) / pH 8 (4), pH 9 (5).
B, pH 5 (6), pH 6 (7).
C, Minimal medium (MM1) (8), KB (9) i LB (10) after one week growth.
 M₂, lambda ladder. M₃, *S. cerevisiae*.

Les fletxes indiquen una tènue banda d'unes 300 Kb observada en algunes de les carreres.
 The arrows show a 300 Kb fragment observed in some electrophoresis.

4.3.3 Avaluació de la tècnica PFGE per a la identificació d'una soca reaïllada després d'inoculada

Els resultats obtinguts amb l'ús de la PFGE van mostrar en el nostre treball que la tècnica esdevenia una eina útil per a la tipificació dels bacteris a nivell de soca. Per poder emprar la tècnica en la monitorització d'una soca concreta d'un bacteri cal que el patró sigui reproduïble i estable en diferents condicions. L'anàlisi del patró de macrorestricció genòmica de la soca EPS288 amb l'enzim *Swa* I ha mostrat ser estable en totes les condicions estudiades, indicant per tant, que la composició i el pH del medi així com la temperatura d'incubació no afecten el patró de bandes característic de la soca (Figura 4.24). Tampoc s'han observat diferències quan la soca inoculada en brou LB procedia d'un cultiu vell. Cal destacar, però, que s'observa una banda en algunes de les carreres on s'hi diposita poc bromur d'etidi, d'una mida al voltant de les 300 Kb que en alguna de les carreres pot observar-se amb més claredat que en altres.

Amb l'objectiu de poder assegurar que el patró de macrorestricció obtingut corresponia a la soca EPS288, va procedir-se també a l'anàlisi amb l'enzim *Xba* I d'alguna de les soques reaïllades, obtenint-se el mateix patró de macrorestricció genòmica que el mostrat per la soca. Un cop avaluada l'estabilitat del patró de restricció en cultius de laboratori, es va estudiar l'estabilitat de *P. fluorescens* 288 rif⁺ en material vegetal, sòl i en matrius d'alginat.

A fi de procedir a la identificació dels reaïllats de *P. fluorescens* EPS288 rif⁺, es van seleccionar colònies a l'atzar de les plaques de cada un dels assaigs realitzats. A continuació es va procedir a preparar *inserts* dels bacteris reaïllats i a la posterior obtenció dels patrons de macrorestricció genòmica corresponents a la digestió amb l'enzim *Swa* I. Els resultats van mostrar que la totalitat de les 20 colònies provades es podien identificar gràcies al seu patró de macrorestricció com la soca EPS288 rif⁺ que s'havia inoculat. En la figura 4.25 es mostren varis dels gels d'electroforesi obtinguts. En algunes de les carreres electroforètiques, es pot observar la presència de la banda de 300 Kb descrita amb anterioritat.

Quant als bacteris reaïllats del sòl i immobilitzats en matriu d'alginat, es va procedir de la mateixa manera que en el cas dels reaïllats dels fruits en l'anàlisi dels patrons de macrorestricció genòmica, i es va obtenir el mateix resultat (Figura 4.25).

Per acabar d'assegurar que els bacteris reaïllats pertanyien a la soca inoculada, va procedir-se a l'anàlisi del patró de restricció generat per l'enzim *Xba* I d'algunes colònies reaïllades. Els gels obtinguts van acabar de confirmar visualment la seva identificació com a la soca EPS288, tal com es mostra a la figura 4.26.

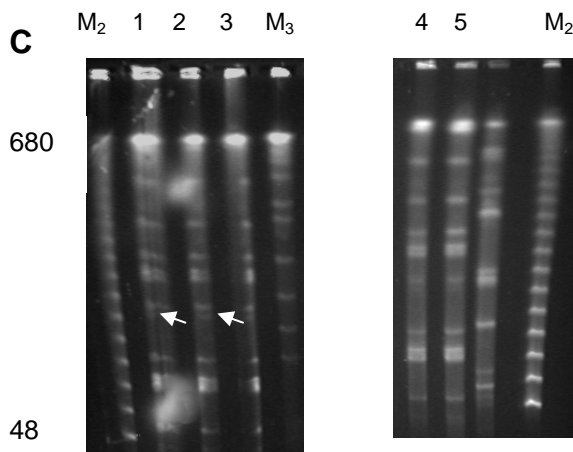
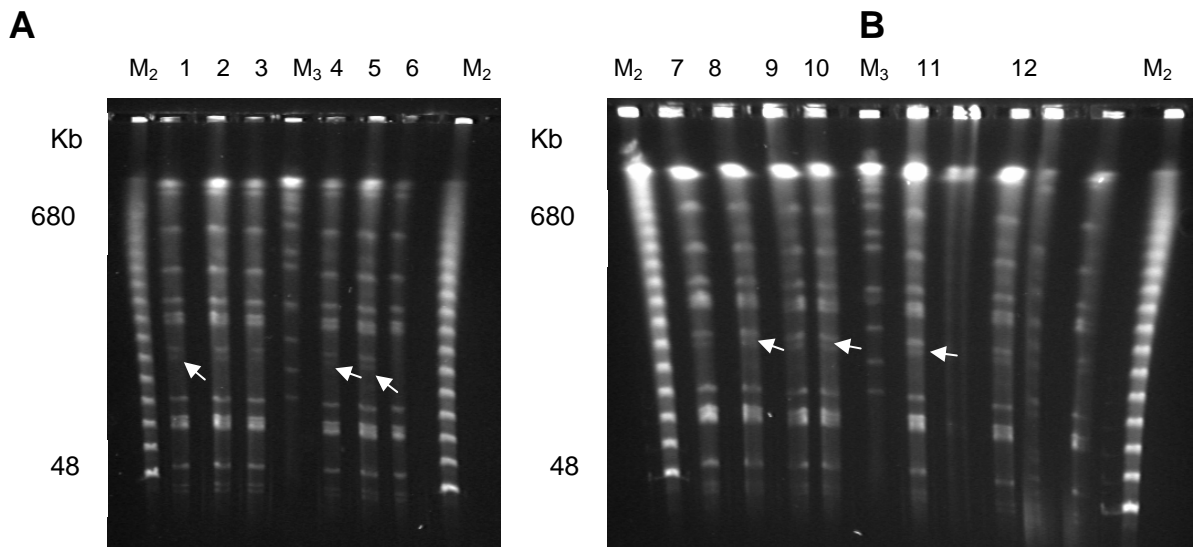


Figura 4.25 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de *P. fluorescens* EPS288 rif⁺, reaïllades de ferides i superfície en peres i pomes inoculades, digerit amb l'enzim *Swa* I i separats per CHEF amb rampes de 5 a 50 s durant 21h a 250 V. Les fletxes indiquen una tènue banda d'unes 300 Kb observada en algunes de les carreres.

Figure 4.25 Macrorestriction patterns of genomic DNA of *P. fluorescens* EPS288 rif⁺ isolated from wounds and surface of apple and pear fruits, restricted with *Swa* I. CHEF electrophoresis with a pulse time increasing linearly from 5 to 50 s for 21 h at 250 V. The arrows show a 300 Kb fragment observed in some electrophoresis

A en peres. EPS288 rif⁺ control (1), interior de la ferida (2, 4), superfície (3, 5, 6) procedents de frigoconservació.

B en pomes a l'interior de la ferida (7), superfície (8, 9); en peres en condicions de laboratori a l'interior de la ferida (10) i a la superfície (11, 12).

C de sòl(1, 2, 3), immobilitzades en una matriu d'alginat durant 4 mesos (4) i 10 mesos (5).

A from pear fruit. EPS288 rif⁺ control (1), wounds (2, 4), surface (3, 5, 6) after cold storage.

B from apple fruit into wounds (7), surface (8, 9) after cold storage ; from pear fruit under laboratory conditions into wound (10), surface (11, 12).

C from soil (1, 2, 3), into an alginate matrix for 4 months (4) and 10 months (5).

M₂, lambda ladder. M₃, *S. cerevisiae*

1 M₂ 2 3 4 M₂

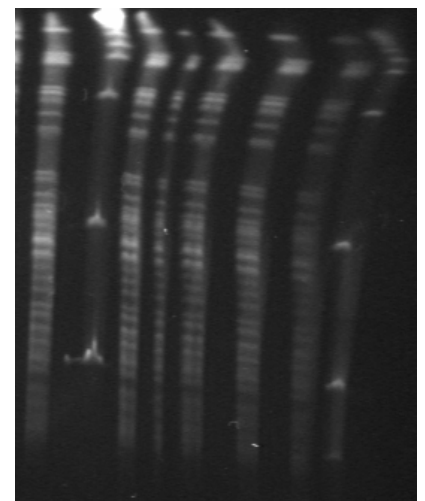


Figura 4.26 Fragments de macrorestricció del DNA cromosòmic de *P. fluorescens* EPS288 rif⁺ digerit amb l'enzim *Xba* I i separats per CHEF amb polsos constants de 5 s durant 21h a 250 V. Control (1), fruits (2), sòl (3), matriu d'alginat (4).

Figure 4.26 Macrorestriction patterns of genomic DNA of *P. fluorescens* EPS288 rif⁺ digested with enzyme *Xba* I. CHEF, pulse time of 5 s for 21 h at 250 V. Control (1), fruits (2), soil (3), alginate matrix (4). M₂, lambda ladder

4.3.4 Caracterització genòmica d'un grup de soques productores de floroglucinol mitjançant RFLP-PCR- rDNA, MRFLP-PFGE, RFLP-PCR i seqüenciació del gen *phlD*

Les soques fluorescentes de *Pseudomonas* productores de l'antibiòtic floroglucinol han mostrat ser un grup important d'ACBs que suprimeixen malalties en un gran nombre de cultius. Donat l'interès de l'estudi de la diversitat fenotípica i genotípica en les soques productores d'aquest antibiòtic, es van realitzar les anàlisis dels apartats anteriors només en el grup de soques productores de floroglucinol, ampliant l'estudi amb les anàlisis d'RFLP del gen *phlD* i la seqüenciació d'aquest gen.

RFLP-PCR-rDNA

Els resultats de l'agrupació de les 25 soques productores de l'antibiòtic floroglucinol es mostren a la figura 4.27.

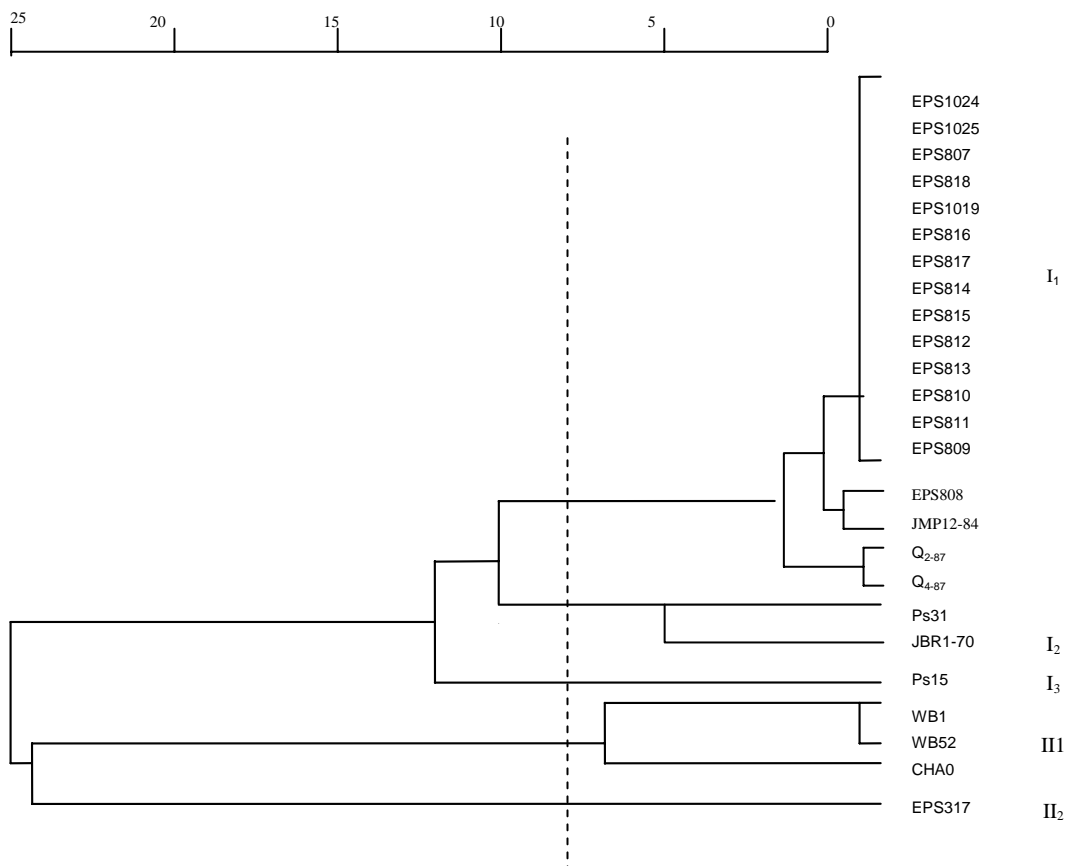


Figura 4.27 Dendrograma de les soques productores de floroglucinol agrupades segons els patrons de restricció de l'amplificat del 16S rDNA i l'ITS amb els enzims *Hae* III, *Taq* I, *Nde* II i *Rsa* I emprant el coeficient de Dice.

Figure 4.27 Dice cluster analysis of restriction patterns of amplified 16S rDNA and ITS with *Hae* III, *Taq* I, *Nde* II i *Rsa* I of phloroglucinol producing strains .

Es van observar 10 patrons de restricció diferents i el patró majoritari va correspondre, exceptuant una soca, a les soques aïllades en aquest treball. De la resta de soques, solament 2 patrons van ser compartits per més d'una soca, les soques WB1 i WB52 per una banda i Q₂₋₈₇ i Q₄₋₈₇ per l'altra. De la totalitat dels patrons definits, no n'hi ha cap que sigui compartit per soques de diferents països d'origen i en canvi sí que s'observa que algunes soques aïllades del mateix país presenten patrons diferents (Ps15 i Ps31; JMP12-84 i JBR1-70).

El més destacable de l'agrupació és la clara diferenciació entre les dues branques principals del dendrograma que permeten separar les soques en dos grans grups (I i II). A un nivell de similitud de 17.5 (tenint el compte el reescalat del dendrograma) els grups se separen en 3 subgrups (I) i 2 (II), respectivament.

MRFLP-PFGE

Pel que fa referència al dendrograma resultant de les anàlisis MRFLP-PFGE (figura 4.28) es van obtenir 13 patrons diferents i, com en el cas anterior, el patró majoritari era idèntic per 10 de les 14 soques aïllades en el present treball. Atesos els resultats obtinguts en aquestes agrupacions i considerant el nivell de resolució de la tècnica, que s'acosta al nivell de soca es va considerar que les soques que compartien el patró 1 i 6 corresponien a clons de la mateixa soca doncs havien estat aïllades del mateix lloc i, per tant, es van mantenir solament les soques EPS807 i EPS817 com a representants dels dos grups.

En el dendrograma de la figura 4.28 s'observa que amb els MRFLP-PFGE no es manté la marcada separació de les soques WB1, WB52, CHA0 i EPS317 respecte la resta, que s'havia observat també amb la tècnica RFLP-PCR-rDNA.

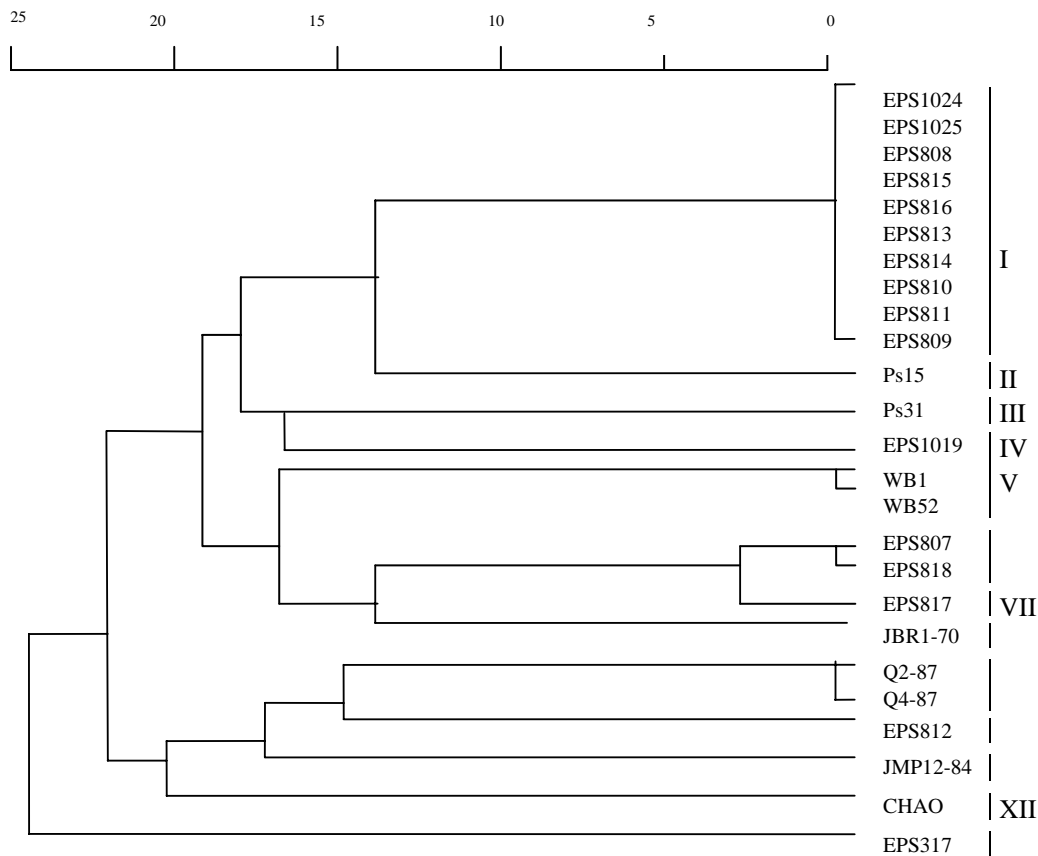


Figura 4.28 Dendrograma de les soques productores de floroglucinol agrupades segons els patrons de macrorestricció genòmica amb l'enzim *Swa* I emprant el coeficient de Dice.

Figure 4.28 Dice cluster analysis of macrorestriction patterns of genomic DNA with *Swa* I.

RFLP- PCR- *phlD*

Per a la realització d'aquest i el següent subapartat es van considerar solament 14 de les 24 soques productores de floroglucinol com ja s'ha comentat anteriorment ja que es va considerar que 10 corresponien a clons de la mateixa soca. En les 14 soques es va obtenir per PCR el fragment esperat de 745 pb corresponent al gen *phlD*. Per a l'anàlisi es van tenir en compte els resultats de les restriccions obtingudes en el capítol 2 amb els enzims *Bsp*H I i *Sal* I, a més de les realitzades en aquest capítol amb els enzims *Hae* III, *Taq* I, *Nde* II i *Rsa* I (Figures 4.29, 4.30).

Les restriccions amb els enzims *Bsp*H I i *Sal* I van separar les soques en 2 grups amb dos patrons diferenciats, mentre que amb la resta d'enzims es van obtenir 3 (*Rsa* I), 4 (*Nde* II), 6 (*Taq* I) i 7 (*Hae* III) patrons diferents. A la taula 4.11 es mostren les mides de la longitud dels fragments obtinguts en les restriccions amb cada un dels enzims i a les taules 4.12 i 4.13 es defineixen els diferents patrons considerats i el resultat tant amb els enzims per separat com amb la combinació dels sis.

Taula 4.11 Mides de les bandes (pb) obtingudes en les restriccions dels amplificats del gen *phlD* amb els sis enzims emprats. Per la resolució dels gels no es van considerar els fragments més petits de 100 pb.

Table 4.11 Fragment sizes (bp) of amplified *phlD* gene with the six enzymes assayed. Because of gel resolution, only fragments higher than 100 pb were considered.

Fragment	Enzim					
	<i>BspH I</i>	<i>Sal I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Taq I</i>	<i>Nde II</i>	<i>Rsa I</i>
1	615	745	370	575	340	680
2	390	562	350	510	300	575
3	221	164	330	330	255	280
4	132	-	300	255	235	195
5	-	-	240	205	200	165
6	-	-	215	180	180	-
7	-	-	180	105	165	-
8	-	-	160	-	-	-
9	-	-	140	-	-	-
10	-	-	115	-	-	-

Taula 4.12 Mides de les bandes (pb) que s'obtenen en cada patró de restricció dels amplificats del gen *phlD* amb els sis enzims emprats.

Table 4.12 Fragment sizes (bp) of each restriction pattern of amplified *phlD* gene with the six enzymes assayed.

Patró	Enzim											
	<i>Taq I</i>						<i>Nde II</i>				<i>Sal I</i>	
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	1	2
	330	575	510	255	510	510	255	340	235	300	560	745
	180	-	180	205	105	-	235	200	165	180	170	-
	-	-	-	105	-	-	165	165	-	140	-	-
Patró	<i>Hae III</i>							<i>Rsa I</i>			<i>BspH I</i>	
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	1	2
	330	300	350	370	300	300	160	575	280	680	400	620
	160	215	180	215	240	215	-	195	165	-	225	135
	-	160	115	180	215	180	-	-	-	-	135	-
	-	-	-	140	-	-	-	-	-	-	-	

Taula 4.13 Patrons individuals i patró combinat dels amplificats del gen *phlD* resultants de les restriccions amb 6 enzims. Els patrons de restricció idèntics en cada cas es designen amb el mateix número.

Table 4.13 Individual and composite 16S rDNA patterns determined by restriction analysis with 6 enzymes of amplified *phlD*. Identical restriction pattern in each case is designated by the same number.

Soques	Enzim						
	<i>BspH I</i>	<i>Sal I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Taq I</i>	<i>Nde II</i>	<i>Rsa I</i>	Combinat
Q ₂₋₈₇	1	1	1	1	1	1	3
Q ₄₋₈₇	1	1	1	1	1	1	3
EPS812	1	1	4	1	2	1	8
EPS807	2	1	2	2	2	1	4
EPS808	2	1	2	2	2	1	4
EPS817	2	1	2	2	2	1	4
JMP12-84	1	1	2	3	2	1	5
JBR1-70	1	1	6	3	2	1	7
PS15	1	1	5	3	2	1	9
Ps31	1	1	2	5	2	1	6
CHA0	2	2	3	4	3	2	1
WB1	2	2	3	4	3	2	1
WB52	2	2	3	4	3	2	1
EPS317	2	2	7	6	4	3	2
<i>Total</i>	2	2	7	6	4	3	8

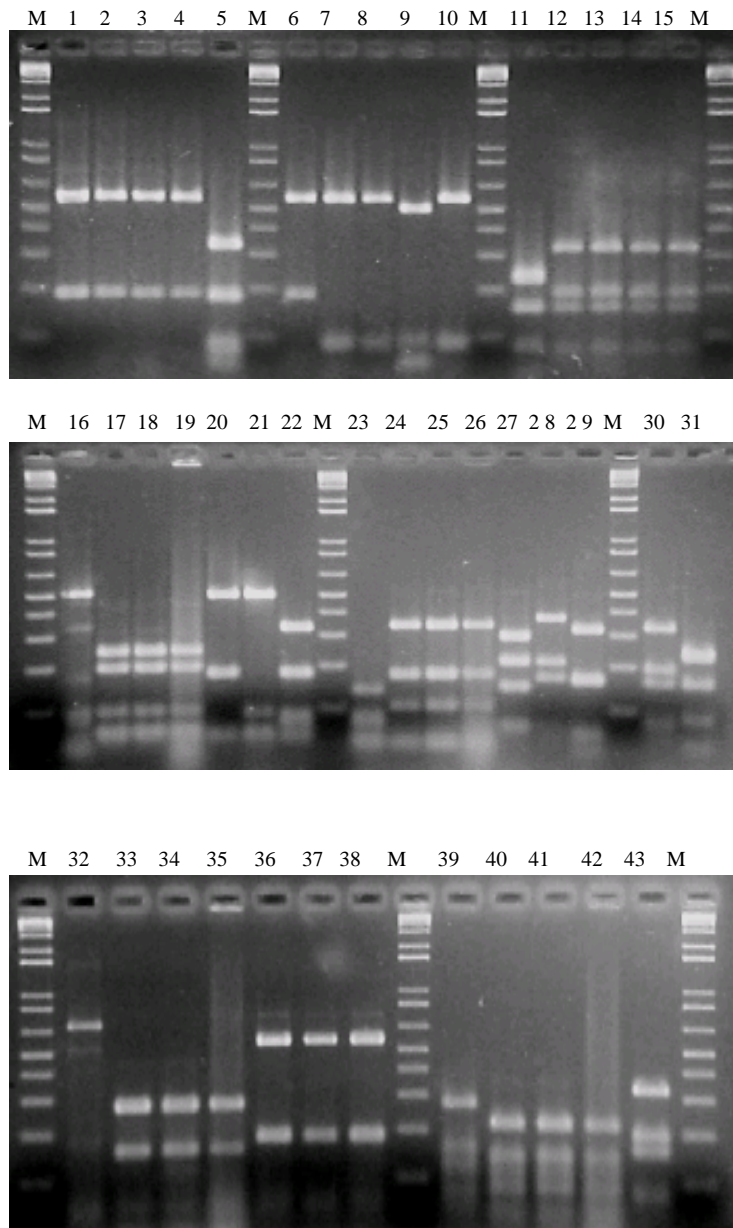


Figura 4.29 Electroforesi dels fragments de restricció amb diferents enzims dels amplificats del gen *phID* realitzada en gel d'agarosa (2.75%). M marcador 1Kb plus DNA.

Figure 4.29 Agarose gel electrophoresis (2.75%) of *phID* restriction patterns with different enzymes. M, 1Kb DNA plus ladder.

- Rsa I** (1) Q₂₋₈₇, (2) EPS807, (3) EPS808, (4) EPS812, (6) EPS817, (32) EPS317, (33) CHA0, (34) WB52, (35) WB1, (36) JMP12-84, (37) Ps31, (38) Q₂₋₈₇
- Taq I** (5) Q₂₋₈₇, (7) EPS807, (8) EPS808, (9) EPS812, (10) EPS817, (16) EPS317, (17) CHA0, (18) WB52, (19) WB1, (20) JMP12-84, (21) Ps31, (22) Q₂₋₈₇
- Hae III** (23) EPS317, (24) CHA0, (25) WB52, (26) WB1, (27) JMP12-84, (28) Ps31, (29) Q₂₋₈₇
- Nde II** (11) Q₂₋₈₇, (12) EPS807, (13) EPS808, (14) EPS812, (15) EPS817, (30) JMP12-84, (31) Q₂₋₈₇, (39) EPS317, (40) CHA0, (41) WB52, (42) WB1, (43) Ps31

Enzim	Mida		JMP						JBR		CHA0	WB1	WB52	EPS317	
	(pb)		Q ₂₋₈₇	Q ₄₋₈₇	EPS812	EPS807	EPS808	EPS817	12-84	1-70					Ps15
<i>BspH</i>	620	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	225	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	135	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Sal I</i>	745	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	560	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	170	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Nde II</i>	340	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	300	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	255	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	235	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	180	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	165	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Hae III</i>	370	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	350	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	330	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	300	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	240	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	215	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	180	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	140	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	115	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Taq I</i>	575	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	510	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	330	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	255	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	205	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	180	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Rsa I</i>	105	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	680	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	575	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	280	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	165	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Figura 4.30 Representació esquemàtica i conjunta dels patrons de restricció de l'amplificat del gen *phlD* amb diferents enzims. Es detalla la mida dels fragments per a cada un dels enzims però sense mantenir l'escala de les mides.

Figure 4.30 Schematic representation of restriction patterns from amplified *phlD* obtained with different restriction enzymes. The representation show the size is not to scale.

A la figura 4.30 es mostra una representació esquemàtica dels patrons obtinguts en cada una de les soques amb la totalitat dels enzims. El resultat de l'anàlisi d'agrupació obtingut (figura 4.30) mostra que hi ha 3 grups de soques; i) EPS807, EPS808 i EPS817; ii) Q₂₋₈₇ i Q₄₋₈₇ i iii) CHA0, WB52 i WB1 que mostren els mateixos patrons amb el conjunt dels 6 enzims. A un nivell de similitud del 15% es poden separar 3 grans grups que es relacionen amb els obtinguts amb els RFLP-PCR-16S rDNA i ITS (Figura 4.31). Els grups A i B d'aquesta agrupació estan formats per les 4 soques corresponents al grup II de RFLP-PCR-rDNA (WB1, WB52, CHA0 i EPS317). Curiosament, en el grup C, se separen en una primera gran divisió les soques de procedència americana de les europees (C₁ i C₂).

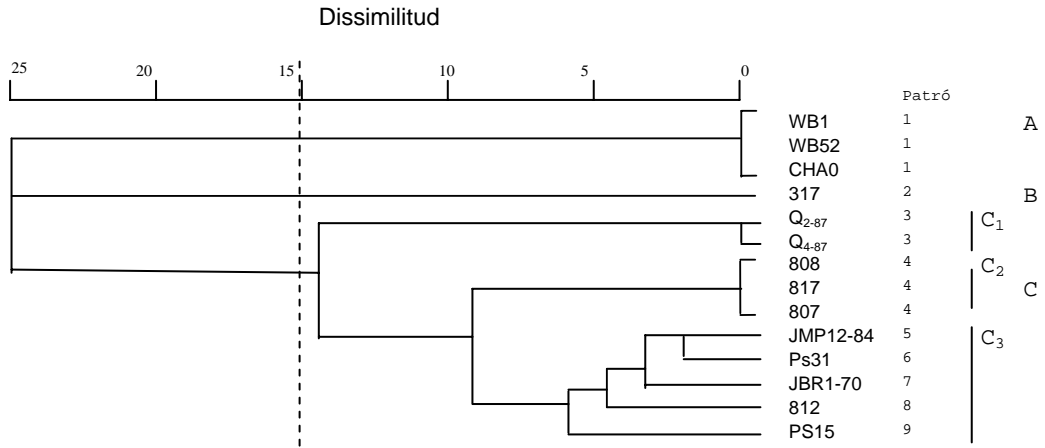


Figura 4.31 Dendrograma de les soques productores de floroglucinol agrupades segons els patrons de restricció de l'amplificat del *phlD* amb els enzims *Sal* I, *Bsp*H I, *Hae* III, *Taq* I, *Nde* II i *Rsa* I emprant el coeficient de Dice. L'escala que es mostra és reescalada.

Figure 4.31 Dice cluster analysis of restriction patterns of amplified *phlD* with *Sal* I, *Bsp*H I, *Hae* III, *Taq* I, *Nde* II i *Rsa* I of phloroglucinol producing strains. Escala bar is a reescaled distance.

Si s'agrupen les dades obtingudes en les tres anàlisis anteriors (RFLP-rDNA, MRFLP i RFLP-*phlD*) s'obté un dendrograma (figura 4.32) on la separació de les soques WB1, WB52, CHA0 i EPS317 continua mantenint-se.

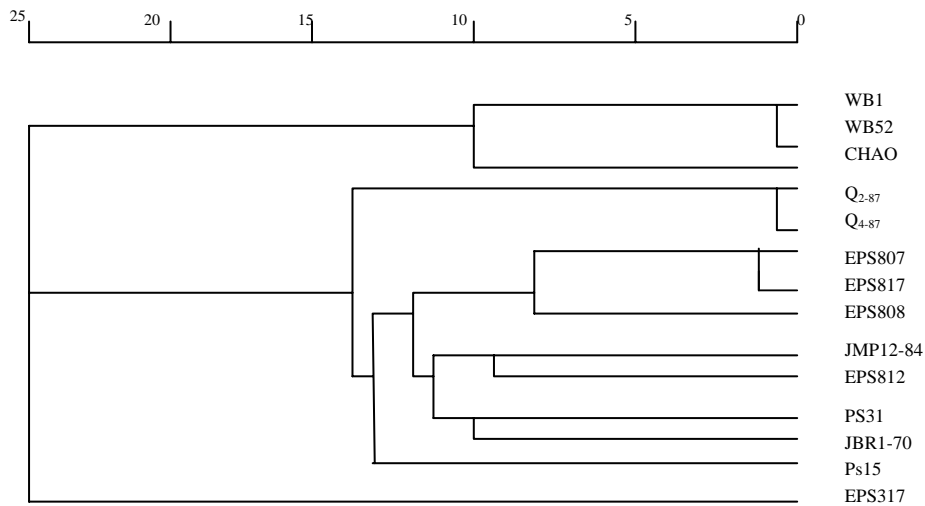


Figura 4.32 Dendrograma de les soques productores de floroglucinol agrupades segons la combinació dels patrons de restricció de l'amplificat del 16S rDNA i l'ITS, del gen *phlD* i els patrons de macrorestricció genòmica emprant el coeficient de Dice. L'escala que es mostra és reescalada.

Figure 4.32 Dice cluster analysis from combined data of restriction patterns of amplified 16S rDNA and ITS, *phlD* gene and macrorestriction patterns of phloroglucinol producing strains. Escala bar is a reescaled distance.

Seqüenciació del gen *phlD*

Un cop obtingudes les seqüències, aquestes es van alinear respecte a la seqüència de la soca Q₂₋₈₇ (GenBank U41818) i es van descartar les primeres i darreres 40 pb, treballant amb una mida total de 664 pb. En l'alineament de les seqüències es va observar una identitat entre les seqüències de les soques WB1-WB52, de Q₂₋₈₇-Q₄₋₉₇ i d'EPS817-EPS807-EPS808-EPS818. D'aquestes seqüències es van emprar en la reconstrucció filogenètica les de les soques WB1, Q₄₋₈₇ i EPS807, com a representants dels diferents grups.

Donat que també es disposava de més de seqüències d'aquest mateix gen dipositades en el GenBank, també es va realitzar l' anàlisi filogenètic amb tot el conjunt de soques.

En la comparació de les seqüències, es van observar 252 llocs polimòrfics del total de 664 pb analitzats (Taula 4.14). Les seqüències del gen *phlD* són divergents entre les soques analitzades com es desprèn del valor de la diversitat nucleotídica obtingut $\pi = 0.12662 \pm 0.01649$, i per tant la variabilitat és del 12.6 % entre totes les seqüències. A la figura 4.33 s'ha representat el càlcul de la mesura d'índex de diversitat molecular dins el gen per cada 10 pb. Es pot observar que hi ha zones que mostren molta variabilitat entre les soques (i per tant, un índex π gran) com per exemple entre els nucleòtids 31-61, 133-154, 264-274 i 435-445, i contràriament, hi altres zones més conservades com les que es troben en les posicions 314-324, 345-355 i 555-565.

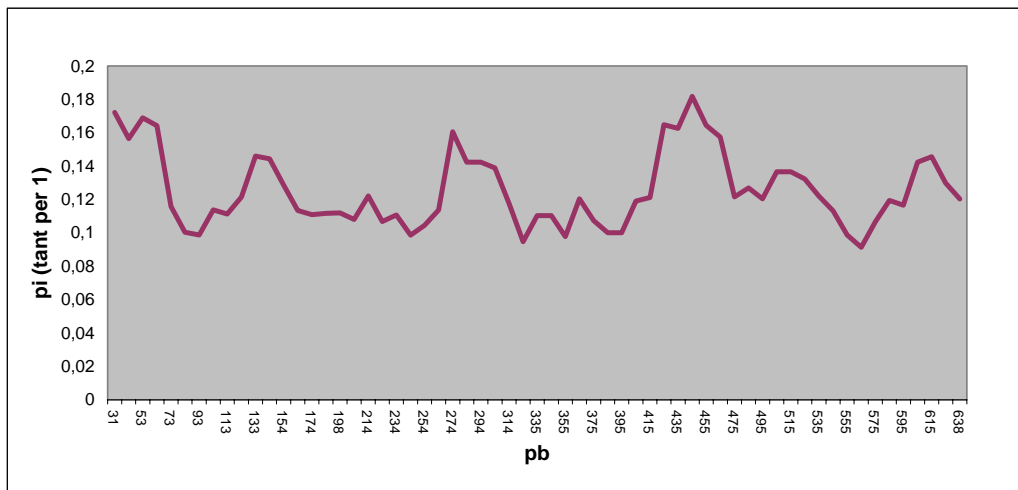


Figura 4.33 Diversitat nucleotídica (π en tant per 1) entre totes les seqüències del gen *phlD*. El càlcul de π s'ha realitzat per cada 10 pb.

Figure 4.33 Nucleotide diversity (π per 1) among all the *phlD* sequences. π has been calculated for each 10 pb.

Els arbres de reconstrucció filogenètica basats en la seqüència del gen *phlD* es mostren en la figura 4.35 Els resultats amb el grup de soques seqüenciades en el nostre treball (EPS807, EPS808, EPS812, EPS818, Ps15, Ps31, JBR1-70, JMP12-84, Q₄₋₈₇ i EPS317) mostra una completa coincidència entre els tres grans grups obtinguts amb les anàlisis de RFLP del rDNA i del gen *phlD*.

En el resultat de l'agrupació de la totalitat de seqüències es mantenen a grans trets les mateixes agrupacions llevat que la separació de les soques per l'origen geogràfic continental no es manté, algunes soques americanes es troben enmig de les europees. Cal destacar que en la branca principal del dendrograma hi ha soques que van ser aïllades de diferents hostes (canya de sucre, blat, cogombre, portaemplets de prunera) i les soques de la segona branca han estat aïllades de tabac, tomata i cotó.

Al comparar els resultats obtinguts amb els RFLPs del gen *phlD* utilitzant els enzims *Sal* I i *Bsp*H I (que s'havien escollit en el Capítol 2 per a confirmar la identitat entre l'amplificat i les seqüències obtingudes), s'observa que les soques *P. fluorescens* EPS317, CHAO, WB1 i WB52 no presenten la diana de tall de l'enzim *Sal* I degut a 2 transversions (canvi d'una pirimidina (Citosina) per una purina (Guanina)) i alhora manca una de les dianes de l'enzim *Bsp*H I degut a una transversió pel canvi d'una purina (Guanina) per una pirimidina (Citosina). Aquest darrer canvi també es produeix en les altres soques obtingudes en aquest treball a excepció de la EPS812.

En el conjunt de totes les seqüències analitzades, es va observar que les soques *P. fluorescens* UP69 i Pf5 presenten els mateixos canvis en les dianes de reconeixement dels dos enzims emprats que les soques EPS317, CHAO, WB1 i WB52. En el cas de les soques F113 i M119, manca també la diana de tall de *Sal* I per una sola transversió en cada una de les soques. Quant a les dos dianes de *Bsp*H I, a la soca Pitr2 s'observa una translocació d'una Guanina per una Adenina. A les taules 4.14 i 4.15 es mostren els canvis que es donen en les diferents seqüències del gen en el conjunt de soques en comparació amb la seqüència de la soca *P. fluorescens* Q₂₋₈₇ per aquests dos enzims.

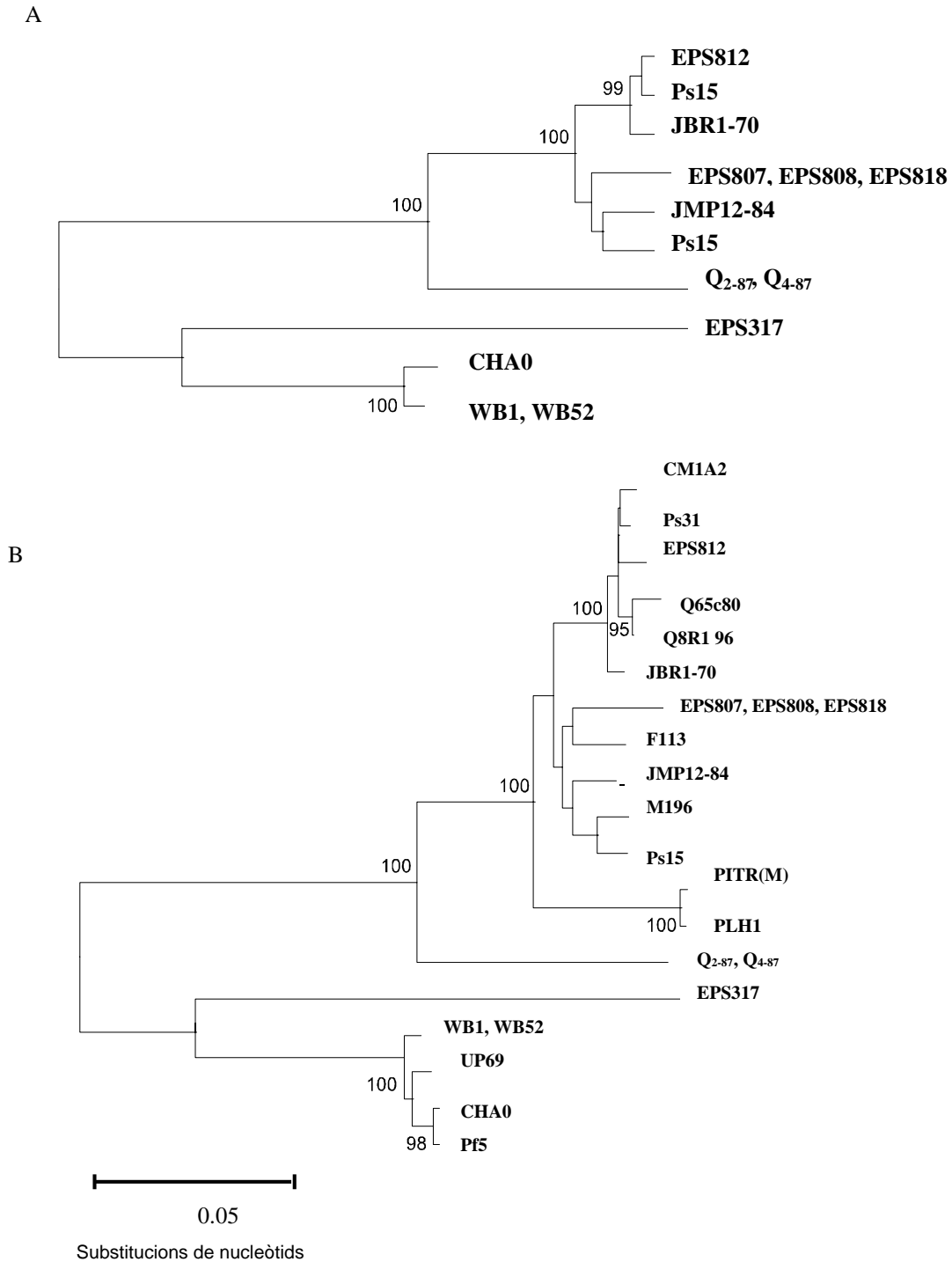


Figura 4.35 Arbres filogenètics de les relacions observades entre les seqüències de *phID* de soques (A) seqüenciades en aquest treball; (B) amb totes les seqüències disponibles. La robustesa dels arbres va ser avaluada amb la realització de 1000 iteracions amb el mètode bootstraps. Els arbres solament mostren els valors superiors o iguals al 90 %. L'escala indica substitucions de nucleòtids per cada posició en la seqüència (5 %).

Figure 4.35 Phylogenetic trees showing the relationships among the *phID* sequences of strains (A) with sequences obtained in this study; (B) with all the available sequences. The robustness of the inferred trees was evaluated by 1000 bootstraps resamplings. The trees only shows values above 90 %. Scale bar indicates nucleotides substitutions per sequence positions (5 %).

Taula 4.14 Canvis observats en la seqüència diana de l'enzim *Sal* I en el gen *phlD* de les soques seqüenciades.

Table 4.14 Changes in the target sequence of *Sal* I enzyme in the *phlD* gene in the sequenced strains .

Soques:	Diana <i>Sal</i> I
Q ₂₋₈₇ (referència)	GTCGAC
EPS317, CHAO, WB1, WB52, UP69, Pf5	GTGGAG
M119	GTAGAC
F113	GTCGAC

Taula 4.15 Canvis observats en les seqüències diana de l'enzim *BspH* I en el gen *phlD* de les soques seqüenciades.

Table 4.14 Changes in the target sequences of *BspH* I enzyme in the *phlD* gene in the sequenced strains .

Soques	Dianes <i>BspH</i> I	
	1	2
Q ₂₋₈₇	TCATGA	TCATGA
EPS317, CHAO, WB1, WB52, UP69, Pf5	TCATCA	-
EPS807, EPS808, EPS817	TCATCA	-
PITR2	-	TCATAA

Es pot apreciar que amb l'anàlisi RFLP-PCR-*phlD* s'obtenen les mateixes agrupacions de les soques que amb la seqüenciació i per tant, podria ser una eina més assequible tant econòmicament com d'infraestructura per a poder estudiar les relacions entre els diversos grups de soques productores de l'antibiòtic floroglucinol.

4.4 Discussió

4.4.1 Anàlisi RFLP-PCR-rDNA

En el present treball, s'ha realitzat una caracterització genòmica de les soques escollides emprant l'anàlisi dels polimorfismes de les restriccions dels amplificats per PCR corresponents al gen 16S rDNA i l'espai intergènic entre el 16S i el 23S rDNA. Es va escollir aquesta anàlisi perquè l'anàlisi ARDRA no semblava molt adequada en la discriminació de soques molt relacionades dins una mateixa espècie. Amb la incorporació de la regió ITS, que és més variable, es pretenia obtenir una major discriminació dins l'espècie *P. fluorescens*. Si se suposa que els polimorfismes que es poden detectar amb una anàlisi de restricció s'incrementen amb la longitud de la seqüència i es té en compte que l'ITS de *P. fluorescens* està entre els 515-600 pb (Gill i col. 1994, Manceau i Horvais 1997, Cho i Tiedje 2000), l'addició de la regió ITS al 16S rDNA, ens havia de permetre treballar amb amplificats de mida prou gran. D'aquesta manera es pretenia augmentar el nombre de polimorfismes ja detectats per altres autors amb l'ús de l'ARDRA en *P. fluorescens* (Laguerre i col. 1994, Frey i col.1997).

Pel que fa referència a la metodologia d'extracció ràpida del DNA bacterià, la metodologia emprada en el present treball va permetre l'obtenció i posterior amplificació per PCR del DNA de 70 de les 72 soques. Però en dues de les soques (EPS264 i EPS317) va caldre la modificació del mètode d'extracció per obtenir resultats. Aquest fet també ha estat descrit en altres treballs que empen aïllats de camp. Així, Nastch i col. (1997), que van emprar una metodologia d'extracció semblant a la nostra, van aconseguir amplificar el 16S rDNA de 1518 d'un total de 1692 soques (90 %). En altres casos i amb protocols diferents Shiomi i col. (1999) no van aconseguir l'extracció o amplificació del DNA en 250 de 500 aïllats de camp de diverses espècies bacterianes.

La mida de l'amplificat del rDNA i ITS obtingut en la totalitat de les soques estudiades en el nostre treball va ser d'aproximadament 2100-2200 pb i, per tant, descomptant els 1500 pb corresponents al 16S rDNA, la longitud de l'ITS concorda amb la descrita per l'espècie *Pseudomonas* que oscil·la entre els 515 i 600 pb (Gill i col. 1994, Manceau i Horvais 1997, Cho i Tiedje 2000). En altres treballs on s'utilitza l'anàlisi RFLP de la regió ITS, es descriuen amplificats de mida molt superior en *P. fluorescens*, si bé no se cita ni el lloc d'anellament dels encebadors ni la mida de l'amplificat obtingut, però s'observen fragments de les restriccions amb una suma de mides molt superior a 600 pb (Nastch i col. 1997, Sharifi-Tehrani i col. 1998).

El més destacat dels resultats de les amplificacions realitzades en el nostre treball va ser l'obtenció de dos fragments d'amplificació d'una mida diferent en 4 de les 72 soques (EPS356, EPS373, EPS375 i EPS378). Després de comprovar acuradament la puresa dels cultius, de la realització de noves extraccions de DNA i de diferents reaccions de PCR, el resultat va ser el mateix. Si els dos fragments obtinguts en l'amplificació haguessin sigut quimèrics, s'hagués esperat que diferents reaccions de PCR donessin resultats diferents, però no sembla ser aquest el nostre cas en haver obtingut el mateix resultat en les diferents amplificacions. Tot i això, es va confirmar aquest resultat amb l'ús d'encebadors que solament amplifiquen la regió ITS. Es van obtenir dos fragments amplificats de diferent mida, resultat que coincideix amb els obtinguts per altres autors en *P. fluorescens* (Cho i Tiedje 2000) així com en diferents espècies i gèneres bacterians com *P. syringae* (Manceau i Horvais 1997) i *Rhizobium leguminosarum* (Laguerre i col. 1996, Palmer i Young 2000) que mostren l'existència d'ITS de mida variable en una mateixa soca.

En 4 de les 72 soques (les mateixes en les que es van obtenir dos fragments d'ITS de mida diferent) es va observar que la suma dels fragments obtinguts després de les digestions amb els enzims era superior a les 4000 pb. Aquest resultat no podia ser degut solament als ITS, sinó que ha d'implicar una heterogeneïtat de seqüència també en les còpies del 16S rDNA entre els operons. L'heterogeneïtat de seqüència de les còpies del 16S rDNA entre operons ha estat descrita en *P. fluorescens* (Latour i col. 1996, Picard i col. 2000), *Campylobacter* (Linton i col. 1994) i en arqueobacteris (Mylvaganam i Dennis 1992), evidenciant la variació intragenòmica en les còpies de l'operó ribosomal en soques individuals. Evidentment, també s'ha de tenir en compte que a vegades, i malgrat l'observació d'un sol fragment d'amplificació aparent, es poden obtenir sumes dels fragments de restricció superiors a la mida del fragment observat com a resultat d'aquesta heterogeneïtat de seqüència entre operons, en l'ITS o en el 16S rDNA com els obtinguts en *P. fluorescens* per alguns autors (Sharifi-Tehrani i col. 1998, Picard i col. 2000).

Els dendrogrames, tant els derivats dels resultats amb els enzims analitzats de manera individual com els de la combinació dels 4 enzims, mostren que les 2 soques de *P. putida* (CECT844, EPS18) es troben barrejades enmig de la resta de soques. Aquest resultat ja s'ha observat en casos en que diferents espècies poden agrupar-se juntes quan les anàlisis es realitzen amb un sol enzim, tot i que aquestes soques que comparteixen el mateix ARDRA corresponguin a soques amb un nivell d'hibridació DNA-DNA inferior al 70 %. Això és indicatiu de que són espècies diferents i de que, malgrat compartir el mateix patró de restricció, les seqüències difereixen (Widmer i col. 1998). En el cas de *Pseudomonas* aquest resultat concorda amb els treballs de Laguerre i col. (1994) i Jaunet i col. (1995) on ja es mostraven agrupades, en l'anàlisi ARDRA, soques de les espècies *P. putida*, *P. fluorescens* i *P. syringae*.

Els nostres resultats també mostren heterogeneïtat en la seqüència dels amplificats. Si bé no hi ha treballs on s'hagi realitzat l'anàlisi conjunta del 16S i l'ITS, si que es poden comparar per separat amb els resultats obtinguts per diversos autors. El gran nombre de patrons observats concorda amb els de l'anàlisi ARDRA de Laguerre i col (1994) que solament amb 10 soques de *P. fluorescens* ja observaven 6 genotips, ampliant-se amb 4 genotips més en el treball de Frey i col. (1997).

Pel que fa referència a l'espai intergènic, Gill i col. (1994) van analitzar 4 soques de *Pseudomonas* mostrant que hi havia una baixa variabilitat a nivell de seqüències, resultat que contrasta amb l'alta heterogeneïtat descrita en *P. fluorescens* (Sharifi-Tehrani i col. 1998, Cho i Tiedje 2000) i *P. syringae* (Manceau i Horvais 1997) i amb la variabilitat trobada en el nostre treball en soques de *P. fluorescens*.

S'observa també en el nostre dendrograma la manca de relació entre les agrupacions obtingudes i els biovars o la producció de metabòlits. Ja al 1996 Keel i col., en un primer treball sobre caracterització genètica amb anàlisi ARDRA de soques productores de floroglucinol, van observar que en les diferents agrupacions obtingudes es trobaven barrejades soques productores i no productores que s'havien inclòs com a controls. La presència d'algunes soques comunes entre el nostre treball i el seu, i la utilització de 3 enzims de restricció comuns, permeten la comparació dels respectius resultats. En aquest sentit, les soques Q₂₋₈₇ i Qc69-80 presenten el mateix resultat en ambdós treballs amb les restriccions amb l'enzim *Rsa* I, però són diferents amb els altres dos enzims, indicant que les diferències han de ser degudes a l'anàlisi de l'ITS incorporat en el nostre treball. En el treball preliminar portat a terme amb seqüències disponibles al GenBank ja havíem observat que amb l'enzim *Rsa* I i a partir de les seqüències de l'ITS no hi havia dianes de tall. Amb la soca 2-79 productora d'àcid fenazin-1-carboxílic, s'han obtingut resultats semblants als del treball de Keel i col. (1996) ja que es troba agrupada enmig de soques productores de floroglucinol, concordant també amb el treball de Picard i col. (2000). El resultat amb anàlisi ARDRA realitzat per varis autors són consistents també amb els realitzats per Moore i col. (1996) amb la seqüenciació del 16S rDNA que van mostrar que l'heterogeneïtat de la seqüència és tan gran entre biovars de *P. fluorescens* com entre aquesta espècie i altres espècies properes. Fins ara, cap treball realitzat a nivell molecular amb l'rDNA ha permès classificar i agrupar les soques en biovars ni ha permès la separació entre les espècies *P. fluorescens* i *P. putida*. Per exemple, en el treball de Christensen i col. (1994) en base a la seqüenciació de les regions variables del 23S rDNA tampoc es van poder establir les separacions en biovars ni entre les dues espècies. Atès que les relacions filogenètiques en base al 16S rDNA no semblen molt adequades en el grup de *Pseudomonas*, Yamamoto i col. (2000) han proposat emprar en aquest grup les seqüències de *gyrB* (que codifica per a la subunitat B de la DNA girasa responsable d'introduir superenrotllaments negatius i implicat en la replicació del cromosoma) i *rpoD* (un dels factors

sigma 70) que sembla que evolucionen més ràpid que el 16S rDNA i amb les que els autors van poder relacionar més bé amb els resultats de les hibridacions DNA-DNA.

Si es té en compte que en el nostre treball s'han emprat soques aïllades de diferents localitzacions geogràfiques, de diferents òrgans i plantes hoste, el resultat obtingut està d'acord amb els de Cho i Tiedje (2000) en soques de *Pseudomonas* (sensu stricto) aïllades del sòl de diferents continents i transectes. En el seu treball van observar que molts dels genotips definits en base a l'anàlisi de la regió ITS eren endèmics. Per a aquests autors, l'aïllament geogràfic a que estan sotmeses és una de les principals causes de la diversificació bacteriana. En conclusió, els resultats obtinguts en l'anàlisi dels polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR dels 16S rDNA i l'espai intergènic estan d'acord amb l'heterogeneïtat descrita en les espècies del gènere *Pseudomonas*, com ho demostra l'obtenció de 39 patrons diferents en el conjunt de 72 soques, de les quals, 70 pertanyen a *P. fluorescens*.

4.4.2 Anàlisi MRFLP-PFGE

Per a la caracterització genòmica també s'ha emprat en el nostre treball l'anàlisi dels fragments de macrorestricció resolts mitjançant PFGE. Si bé en la revisió bibliogràfica s'han descrit altres tècniques alternatives a la PFGE per a la caracterització global del genoma, es va escollir la PFGE perquè havia mostrat ser una eina molt discriminatòria en altres treballs a nivell intraespecífic (Grothues i Rudolph 1991, Salama i col. 1992, Suzuki i col. 1993, Pantucek i col. 1996, Tamplin i col. 1996, Bert i col. 1997, Tynkkynen i col. 1999, Garaizar i col. 2000) i, alhora, podia esdevenir una tècnica útil en un futur dins el nostre grup de recerca.

No es pot oblidar que les tècniques per a l'estudi global del genoma basades en la PCR també han estat molt utilitzades, ressaltant com a més importants els AFLPs, RAPs i rep-PCR. La tècnica AFLP, amb la seva estratègia d'amplificació, és la que més s'aproxima a la idea de visió global del genoma. En els altres dos casos, les seqüències que hibriden amb els encebadors podrien estar situades majoritàriament en una part del genoma, tot i que està admès que en el cas de rep-PCR la distribució dels elements repetitius (ERIC, BOX i Rep) es troba dispersa en la totalitat del genoma (Versalovic i col. 1991, de Bruijn i col. 1992, de Bruijn i col. 1996). La PFGE pot resoldre part o tot el genoma i, si bé la durada del procés és més llarga que la de les tècniques de PCR, els seus resultats han mostrat ser altament reproduïbles entre diferents laboratoris (Garaizar i col. 2000) i, per tant, s'ha considerat una eina molt útil a l'hora de realitzar la tipificació de soques i permetre l'obtenció de biblioteques genòmiques que podrien incloure's en bases de dades i restar disponibles per a la comunitat científica.

En la posta a punt de la tècnica van provar-se dos protocols per realitzar la lisi de les cèl·lules incloses en els blocs d'agarosa: el protocol 1 (Smith i col. 1988) i el protocol 2 (Römling i Tümmeler

1991). Alhora es va associar als dos protocols una metodologia de neteja de les restes cel·lulars consistent en (1) la realització d'un gel de precarrera en el protocol 1, i el rentat amb tampó TE en el protocol 2. Malauradament, la neteja de les restes cel·lulars amb el protocol 1 no va donar resultats satisfactoris. Si bé el principal inconvenient de la realització de la precarrera és la seva durada temporal, l'avantatge més important rau en que permet posar en evidència el material extracromosòmic inferior a 1 Mb, però, en el nostre cas va comportar la completa degradació del DNA en la precarrera de neteja.

Contràriament, van obtenir-se bons resultats amb el protocol 2 de lisi cel·lular i amb el rentat de les restes cel·lulars amb tampó TE. Sembla, doncs, que la degradació del DNA es produïa durant les 36 hores de precarrera electroforètica, possiblement per l'actuació d'endonucleases endògenes que no havien estat inactivades per la proteïnasa K.

De fet, en la posta a punt de la tècnica de PFGE per a una espècie bacteriana, àdhuc sense la utilització de protocols on es realitza una precarrera, s'han trobat casos on no es podia obtenir el DNA cromosòmic intacte com en algunes soques de l'espècie *Erwinia amylovora* (Zhang i Geider 1997). En aquest darrer cas es va canviar el tampó emprat en l'electroforesi per resoldre el problema d'activació d'endonucleases que tenia lloc suposadament per la presència de Tris en els tampons.

En el nostre treball no van provar-se altres tampons a l'hora de realitzar la precarrera de neteja per resoldre el problema de la degradació del DNA, malgrat l'avantatge que amb aquell protocol s'haguessin extret els plasmidis, en cas de ser presents en les nostres soques. Cal tenir en compte, però, que la presència de plasmidis en soques aïllades a camp en l'espècie *P. fluorescens* presenta una freqüència molt baixa. Només en aïllats de sòls industrials s'observen freqüències elevades de plasmidis (Campbell i col. 1995b, Latour i col. 1996). Es tracta de plasmidis conjugatius del grup IncP d'una mida aproximada de 50 Kb associats amb resistència a metalls pesants i/o portadors de gens catabòlics. Tot i que amb el protocol 2 no podem afirmar que no hi hagi plasmidis presents, tampoc és molt important aquest aspecte donat que el nostre objectiu era una caracterització genòmica global. Per tant, en aquesta es pot incloure, a més del DNA cromosòmic, el material extracromosòmic.

En conseqüència, es va escollir el protocol 2 de lisi cel·lular i el rentat per a la neteja del DNA inclòs en el bloc d'agarosa, amb l'avantatge de la seva curta durada temporal. Es van realitzar les proves preliminars amb els enzims de restricció de tall poc freqüent que s'havien seleccionat seguint els criteris de McClelland i col (1987) escollint l'enzim *Swa I* perquè va generar patrons de macrorestricció que podien ser avaluats amb les eines de les quals disposàvem. Dos dels altres enzims (*Xba I* i *Spe I*) van produir un nombre de bandes excessiu que era de difícil anàlisi però

que van esdevenir útils per a la diferenciació qualitativa de soques que van presentar el mateix patró de macrorestricció genòmica amb *Swa* I.

En el nostre treball s'han caracteritzat un total de 72 soques de *P. fluorescens* observant-se un total de 54 patrons de macrorestricció genòmica diferents. El percentatge del genoma analitzat ha estat variable entre les soques i, majoritàriament, s'ha resolt més del 50 % encara que hi ha tres soques en les que s'ha resolt menys d'un 30 % del genoma. L'alt nombre de patrons diferents de macrorestricció genòmica obtinguts posa de manifest la gran diversitat intraespecífica.

És molt interessant, però, el resultat obtingut en algunes de les soques que han mostrat el mateix patró de macrorestricció genòmica amb l'enzim *Swa* I. Donat que en el nostre treball es resolía solament una finestra de mides de fragments de macrorestricció que van oscil·lar de les 48 a les 680 Kb, no podem assegurar que la totalitat del genoma presenti aquesta identitat. Per aquest motiu van emprar-se altres enzims de restricció amb dianes de reconeixement que es troben més freqüentment que si bé no van ser avaluats quantitativament ho van ser qualitativament. Els resultats amb els enzims *Spe* I i *Xba* I van permetre obtenir altres patrons i quan aquests patrons eren idèntics pel mateix conjunt, possiblement es pot afirmar que es tracta de la mateixa soca, atès que aquests grups de soques provenen en alguns casos de la mateixa mostra i en altres de mostres diferents però d'un mateix origen geogràfic.

L'estudi més semblant al portat a terme per nosaltres ha estat el realitzat per Rainey i col. (1994a), on es va realitzar l'anàlisi dels fragments de macrorestricció de 32 aïllats epífits que formaven part del grup de les *Pseudomonas* fluorescents. Els aïllats procedien de la fillosfera de canya de sucre en el transcurs d'un període de creixement en un camp de conreu. Si bé tots els aïllats van mostrar estar molt relacionats segons els perfils d'àcids grassos, es van poder observar 8 agrupacions genòmiques mitjançant PFGE. En general, els aïllats el mateix dia i en el mateix tipus de fulla (juvenil, madura o senescent) pertanyien al mateix grup genòmic. Els aïllats en diferents dates i tipus de fulla mostraven solament un 50 % de similitud entre ells, refermant la influència del tipus de fulla en la població epífita a nivell fenotípic descrita per Ercolani (1991). Rainey i col. (1994a) també van descriure una alta diversitat dels perfils de macrorestricció entre els aïllats del biovar V, com l'observat en el nostre treball.

Varis autors suggereixen que l'alta heterogeneïtat genotípica de l'espècie pot reflectir la baixa homologia en les hibridacions DNA/DNA descrita dins el gènere *Pseudomonas* per Johnson i Palleroni (1989). En aquest sentit, s'ha descrit una diversitat molt elevada en els patrons de macrorestricció genòmica en *P. stutzeri* (Rainey i col. 1994b), *P. syringae* pv *tomato* (Denny i col. 1988) i *Ralstonia solanacearum* (Hayward 1991).

L'elevada diversitat genòmica observada en *P. fluorescens*, considerat com a sapròfit, contrasta molt amb la baixa diversitat genètica que s'observa en poblacions de bacteris fitopatògens. De fet, en la realització del nostre treball es van escollir tot un conjunt de soques no antagonistes o incapaces d'inhibir les infeccions causades per diferents patògens per poder comparar els resultats obtinguts amb les soques antagonistes o capaces d'inhibir les infeccions, que realment eren l'objectiu del treball. Donat que el nombre d'aquestes soques, potencials ACBs, és relativament baix, es podria pensar que comparteixen alguna singularitat comuna. Els percentatges obtinguts en diferents treballs mostren, per exemple, que solament un 1 % d'aïllats procedents de soja van ser antagonistes de *P. syringae* (Leben 1964) o un 10 % d'aïllats de *Bacillus* eren antagonistes del fong *Rhizoctonia solani* (Kim i col. 1997). Si els percentatges obtinguts en les prospeccions són baixos, semblaria indicar que les soques antagonistes poden compartir molts trets en comú. Possiblement, tal com apunten alguns autors, l'homogeneïtat que mostren alguns bacteris fitopatògens sigui conseqüència de l'especificitat de l'hoste com en el cas de *Clavibacter michiganensis* (Morgen i col. 1990), *Ralstonia solanacearum* (Smith i col. 1995) o *Erwinia amylovora* (Zhang i Geider 1997). També s'ha demostrat una certa homogeneïtat en altres casos on el bacteri ocupa un nínxol ecològic molt específic, com seria el cas de *Rhizobium* (Harrison i col. 1989). En el costat oposat, els bacteris epífits de l'espècie *P. fluorescens* no mostren una especificitat tan estreta.

En altres treballs s'han emprat tècniques per a la caracterització genòmica global de *P. fluorescens* diferents dels MRFLP-PFGE i el resultat està d'acord amb l'obtingut per nosaltres amb MRFLP-PFGE, en el sentit d'obtenir més discriminació entre soques que utilitzant anàlisis com ARDRA. Varis autors aplicant la tècnica de rep-PCR en soques de *P. fluorescens* que presentaven el mateix patró ARDRA del 16S rRNA, van obtenir patrons diferents amb ERIC-PCR (Frey i col. 1997), Rep-PCR. (Latour i col. 1996) i Box-PCR (Cho i Tiedje 2000). Igualment, amb la utilització d'AFLPs, Geornaras i col. (1999) van descriure també l'alta diversitat genotípica en soques de *P. fluorescens* aïllades d'una planta de processament de pollastres.

Quant a la tècnica RAP, hi ha estudis realitzats amb *Pseudomonas* però els problemes de reproducció de la tècnica han fet que no sigui molt utilitzada en treballs de diversitat. Cal citar que alguns autors que l'han emprada també obtenen nivells de discriminació elevada; per exemple, Moënné-Loquez (1996) va observar molta divergència en els patrons. Si bé autors com Picard i col. (2000) han provat la reproducció dels RAPs en tres experiments diferents, s'ha vist que uns dels factors més importants són l'extracció de DNA, el termociclador i la marca de Taq polimerasa. Això fa que els resultats puguin diferir entre laboratoris la qual cosa no succeeix amb la PFGE (Garaizar i col. 2000).

Amb l'ús del conjunt de tècniques rep-PCR per caracteritzar *P. fluorescens* s'ha posat de manifest la influència tant del sòl (tipus de sòl, cultivat o no) i de la planta (espècie) en la selecció de la població de *P. fluorescens* de la rizosfera (Lemanceau i col. 1995, Latour i col. 1996). Varis estudis han mostrat que la textura del sòl influeix en la supervivència de diferents soques (Van Elsas 1986) i que el tipus de fulla i el temps de mostreig influeixen en la població epífita en plantes (Ercolani 1991, Rainey i col. 1994a). Aquesta influència que exerceixen el sòl i la planta ajudaria, en part, a explicar la gran diversitat genòmica observada en els nostres aïllats, ja que procedien de mostres totalment heterogènies quant a localització geogràfica, planta hoste i òrgan d'aïllament.

Tot i el fet d'una desmesurada diversitat en els patrons de macrorestricció de les soques de *P. fluorescens* del nostre treball, no pot descartar-se aquesta tècnica per utilitzar-la posteriorment tenint en compte que solament s'ha emprat un enzim de restricció i s'ha resolt una part del genoma. Cal tenir en compte la importància que té l'elecció de l'enzim de restricció en les posteriors anàlisis a realitzar ja apuntat en estudis amb enzims de tall freqüent (Giovannetti i col. 1990). En el cas de la PFGE els enzims que tallin en molts o pocs fragments poden sobreestimar o infraestimar, respectivament, el grau de similitud entre soques (Grothues i Tümmler 1991, Rainey i col. 1994a).

Malgrat tot, aquesta alta heterogeneïtat esdevé una eina útil ja que, en la majoria de casos, el patró és característic de cada soca permetent la identificació d'aquesta quan s'ha reaïllat de diferents sistemes on hagi estat inoculada. La tècnica de la PFGE també pot emprar-se com a tècnica per verificar la identitat de la soca en qüestió a fi de protegir-la en patents d'ús com a ACB o en estudis de traçabilitat. Aquesta capacitat de discriminació a nivell de soca és també una eina molt útil perquè permet discriminar entre diferents soques aïllades de la mateixa procedència o mostra. Així, en el nostre treball hem considerat que l'obtenció del mateix patró de macrorestricció, identificava clons de la mateixa soca, permetent depurar una col·lecció de soques per realitzar estudis concrets.

Per poder emprar la tècnica per a la monitorització i identificació de la soca d'interès cal que el patró de macrorestricció obtingut sigui estable en el temps i en diferents condicions ambientals. En el nostre treball, el patró de macrorestricció de la soca *P. fluorescens* EPS288 utilitzada com a model s'ha mantingut estable en totes les condicions assajades, que han implicat modificacions del pH, temperatura o composició del medi de cultiu, en cultius vells de més d'una setmana i inclusivament quan la soca ha estat inoculada en fruits, sòls i matrius d'alginat. S'ha de dir que s'han portat a terme pocs treballs estudiant l'estabilitat del patró de macrorestricció en bacteris. Ginard i col. (1997) van realitzar solament una comprovació variant les condicions de temperatura durant el creixement de cultius de *P. stutzeri* i van observar que el patró era estable. S'ha descrit,

però, que en el laboratori pot ser que es produeixin grans inversions del genoma, com les observades en el cromosoma de *P. aeruginosa* clon C aïllat de pacients amb fibrosi quística (Römling i col. 1997). Kiewitz i Burkahard (2000) i Kiewitz i col. (2000), treballant també amb *P. aeruginosa*, van demostrar que les seqüències de gens eren menys polimòrfiques que els patrons de macrorestricció i, per tant, les insercions, delecions i rearranjaments sembla que contribueixen a la diversitat cromosòmica. Els canvis en els patrons de PFGE en el seu treball eren causats per insercions i delecions (92 %) i per mutacions puntuals en els llocs de reconeixement de l'enzim *SpeI* (8 %). De totes maneres, aquests autors creuen que, si bé s'han demostrat les inversions en condicions de laboratori, aquestes tenen lloc poc probablement en el medi natural.

En els estudis per comprovar l'estabilitat del patró de macrorestricció en condicions de laboratori amb la soca EPS288, ja s'ha comentat que en alguns dels patrons s'observa una banda d'una mida aproximada de 300 Kb. No s'ha aprofundit en si la banda era el resultat de la diferent concentració de cèl·lules en el DNA inclòs en el bloc d'agarosa, d'un artefacte, si podia provenir d'alguna mutació durant el període de cultiu o si bé era un plasmidi. Tot i la presència d'aquesta banda, el patró de macrorestricció continua essent tan característic de la soca que no comporta cap problema a l'hora de la seva identificació. Si fos un plasmidi sense cap punt de tall de l'enzim emprat, la mobilitat de la banda hauria estat variable; solament mantindria constant la distància respecte a l'origen si s'hagués linealitzat i, per tant, fos un plasmidi amb una diana de restricció o bé si ja fos un plasmidi lineal. Semblaria més lògic pensar en un plasmidi si s'observés en mostres reaïllades de sistemes no estèrils ja que el bacteri podria haver-lo adquirit per transferència horitzontal d'un altre bacteri o, en el cas de que s'observés amb claredat en els controls i no en les mostres reaïllades, podria indicar la pèrdua d'aquest plasmidi. En el nostre cas, aquesta banda s'observa en alguns controls i també en alguns dels reaïllats; per tant, la segona possibilitat no es pot descartar. En aquest sentit, Campbell i col. (1995a) i Latour i col. (1996) mostren que en *P. fluorescens* la freqüència d'aïllats portadors de plasmidis en sòls agrícoles és extremadament baixa. Rainey i Bailey (1994a) també van observar que dos aïllats de la mateixa mostra es diferenciaven solament per la presència d'una banda menys intensa d'unes 400 Kb en un d'ells que es va pensar que era un plasmidi. Els seus intents per aïllar el plasmidi van ser infructuosos amb el mètode provat mentre que n'aïllaven d'altres de mida semblant en bacteris controls.

Després de comprovar l'estabilitat del patró de macrorestricció en condicions de laboratori, s'ha avaluat la tècnica de la PFGE per a la identificació com a *P. fluorescens* EPS288 de reaïllats de fruits mantinguts en cambres de frigoconservació, del sòl i de matrius d'alginat. En cada un d'aquest sistemes les condicions són més extremes que en el laboratori. Per exemple, són extremes les condicions en l'emmagatzematge de fruits, en atmosfera controlada en el cas de les pomes (1.25 % O₂, 1.5 % CO₂ i 0.8 °C) i en atmosfera modificada en fred en el cas de les peres (1 °C). Així mateix, dins les matrius d'alginat, les condicions en les quals es troben les cèl·lules no

són condicions favorables en no disposar de nutrients suficients i estar limitada la disponibilitat d'oxigen.

Així, un cop obtinguts varis aïllats seleccionats a l'atzar de cada un dels experiments en fruits, sòl i matriu d'alginat, es va procedir a l'obtenció del seu patró de macrorestricció genòmica. La tècnica de la PFGE va identificar com a *P. fluorescens* EPS288 a tots els reaïllats, mostrant que el patró de macrorestricció es mantenia estable en tot el ventall de condicions provades. Amb els resultats obtinguts podem concloure que la tècnica MRFLP- PFGE ha mostrat ser una eina d'identificació de soques a nivell molecular molt útil per a la realització de treballs de monitorització de *P. fluorescens*. Si bé en el nostre treball l'absència de *Pseudomonas* fluorescents resistents a la rifampicina en els testimonis no inoculats (en el cas de fruits i sòl) feia útil la utilització d'aquesta resistència com a únic marcador en els estudis, és important tenir una eina d'identificació a nivell molecular perquè també hi ha casos on s'han trobat *Pseudomonas* indígenes resistents a antibiòtics interferint en l'assaig (Bakker i col. 1991, Rattray 1993). En sistemes no estèrils, disposar d'una tècnica per a la caracterització de soques de *P. fluorescens* és una eina molt útil en la identificació de reaïllats després d'haver estat inoculats que permet evitar la interferència d'altres bacteris resistents a l'antibiòtic autòctons.

4.4.3 Diversitat genotípica de les soques productores de floroglucinol

Com s'ha comentat anteriorment, les soques productores de floroglucinol han estat un dels grups de *P. fluorescens* més estudiat d'ençà que es va demostrar la seva activitat com a agents de control biològic (ACB) en la malaltia del "Take all" del blat. Aquest fet va propiciar que des dels primers estudis portats a terme per Keel i col. (1996), s'hagin publicat nombrosos treballs que han estudiat la diversitat entre soques que comparteixen l'habilitat de produir Phl tant a nivell fenotípic com genotípic (Sharifi-Tehrani i col. 1998; Picard i col. 2000, McSpadden i col. 2000, 2001, Mavrodi i col. 2001). El principal objectiu de tots aquests estudis ha estat determinar les relacions que es pugin establir entre la caracterització fenotípica i genotípica en relació al biocontrol.

En l'estudi de Keel i col. (1996) ja s'havia mostrat una considerable diversitat genotípica entre soques de *Pseudomonas* productores de floroglucinol procedents de diferents orígens geogràfics mitjançant anàlisi ARDRA. Els tres grans grups resultants de l'anàlisi mostraven agrupades, per una banda i en un grup molt homogeni, les soques productores de cianhídric (HCN), Pioluteorina (Plt) i floroglucinol (Phl) i, per l'altra banda, dos grups amb soques productores de Phl i HCN que eren més diverses genèticament. Aquests resultats van coincidir amb els obtinguts en els treballs de McSpadden i col (2000) amb anàlisi ARDRA i també per Sharifi-Tehrani i col. (1998) a partir d'una anàlisi RFLP dels amplificats de part de l'operó ribosomal.

En el nostre treball, on s'ha emprat com a diana per amplificar la seqüència conjunta del 16S rDNA i l'ITS, s'observa també en primer lloc una clara divisió entre dos agrupacions. Una d'aquestes agrupacions se separa a un nivell de similitud molt baix en dues branques. Per una banda i de manera aïllada, la soca EPS317 i, per l'altra banda, les soques WB1, WB52S i CHA0. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en el treball de McSpadden i col. (2000) quant a la peculiaritat de la soca CHA0. Els fragments obtinguts de les digestions del 16S rDNA per aquest autor i, en el cas del nostre treball, els obtinguts amb el 16S rDNA i ITS de la soca CHA0, han mostrat ser diferents als de la resta de soques productores de PhI.

Si es té en compte el resultat obtingut en les agrupacions dels RFLP-*phlD*, s'observa que també s'obté aquesta separació entre els dos principals grups de soques. En els RFLP-*phlD* a un nivell de similitud baix, se separen tres branques: (1) el grup de les soques WB1, WB52 i CHA0; (2) la soca EPS317 i (3) la resta de soques.

Els nostres resultats estan en concordança amb els descrits per Keel i col. (1996) quant a que les primeres separacions en les agrupacions siguin degudes al patró de producció de metabòlits, un primer grup productor dels metabòlits PhI, Plt i HCN i el segon productor de PhI i HCN. Si bé en el nostre treball no s'ha estudiat la producció de Plt per part de les soques, si que s'han caracteritzat envers la producció i presència d'un fragment de DNA implicat en la síntesi de la pirrolnitrina (Prn) i, curiosament, les soques WB1, WB52S i CHA0 comparteixen el fet de tenir els enzims implicats en la síntesi de PhI i Prn. Malgrat que en el seu treball no es tenia en compte la producció de Prn, altres treballs amb soques com la Pf5 mostren que també són productores de pirrolnitrina (Pfender i col. 1993, Mavrodi i col. 2001), la qual cosa fa pensar que el grup de soques que mostren una homogeneïtat molt elevada siguin soques capaces de produir HCN, Plt, PhI i Prn.

Si solament tenim en compte les soques productores de PhI aïllades en el nostre treball, en les anàlisis de la part de l'operó ribosomal s'observa que, a excepció d'una (EPS808), la resta de soques (14) presenten el mateix patró amb el conjunt d'enzims, tot i que el patró d'EPS808 es mostra molt relacionat al grup. La presència d'una banda de diferent mida en EPS808 fa que estigui separada possiblement degut a una mutació puntual en una de les dianes de tall dels enzims de restricció. Aquest resultat era força esperable si es té en compte que en la major part d'estudis s'han obtingut resultats semblants quan els aïllats tenien la mateixa procedència. En el cas del treball de Picard i col. (2000), que van realitzar aïllaments de soques productores de PhI de les arrels de blat en diferents estadis de creixement, es van obtenir solament 6 patrons en l'anàlisi ARDRA i la major part dels aïllats (150 d'un total de 167) compartien un únic patró. Els mateixos resultats s'han obtingut amb la utilització d'altres tècniques de caracterització genètica; per exemple, McSpadden i col. (2000) emprant ERIC-PCR en l'anàlisi de 138 soques aïllades de 8

sòls diferents i 4 localitzacions geogràfiques van observar que hi ha pocs genotips diferents en cada un dels sòls i que en la majoria de casos s'observava un genotip predominant.

En el nostre cas, el predomini d'un genotip en la totalitat d'aïllats procedents del viver Agromillora Catalana S.A. observat amb l'anàlisi de part de l'operó ribosomal es ratifica amb l'anàlisi MRFLP-PFGE en 10 de les soques. De la totalitat de les 13 soques, 10 comparteixen el mateix patró i, tenint en compte el nivell de discriminació de la tècnica, s'haurien de considerar clons de la mateixa soca. Per tant, si de les 13 soques aïllades de la mateixa procedència solament es distingeixen 4 patrons, el predomini d'un dels genotips en un determinat sistema concorda bé amb els resultats comentats d'altres treballs tot i emprant diferents tècniques de caracterització genotípica. D'acord amb aquest resultat es van prendre per la realització de la resta d'anàlisis solament 4 soques (EPS817, EPS808, EPS812 i EPS817) representants del total d'aïllades.

Cal destacar que amb l'ús de la tècnica MRFLP-PFGE, els resultats van mostrar que hi havia grups de soques que compartien el mateix patró, per exemple el cas de Q₂₋₈₇ i Q₄₋₈₇, en les que Keel i col. 1996 també van observar que els patrons obtinguts en ambdues eren idèntics amb la tècnica RAP. De fet, les dues soques són aïllades del mateix lloc geogràfic (i més concretament del mateix camp de conreu) en diferents anys i, per tant, probablement corresponen a la mateixa soca.

En conclusió, tant les anàlisis de part de l'operó ribosomal com de part del genoma emprats en el nostre treball mostren una alta diversitat genotípica en un grup seleccionat de soques respecte a la capacitat de producció d'un determinat metabòlit i, per tant, que són semblants a altres grups de soques de *P. fluorescens* de referència sense haver estat seleccionades prèviament. Les causes que s'ha apuntat per explicar aquesta diversitat genotípica contemplen, segons Spiers i col. (2000), causes ecològiques (com l'oportunitat ecològica) i la competició, a més de causes genètiques on s'inclourien les mutacions i les recombinacions. De fet, l'efecte de diferents factors a nivell intraespecífic es posa de manifest en aquelles espècies en les que ja hi ha de manera natural un alt grau de diversitat genètica (Achouack i col. 2000a) i, per tant, els resultats obtinguts per nosaltres recolzen aquestes teories.

Pel que fa referència a l'anàlisi RFLP-*phlD* i a la seqüenciació d'aquest gen, els resultats indiquen que les agrupacions obtingudes són exactament les mateixes en ambdues tècniques. Per tant, la utilització dels RFLP-*phlD* és molt adient per a la realització d'estudis de diversitat genotípica entre soques productores de Phl. Els avantatges que això comporta són tant econòmics com de facilitat per a l'obtenció de patrons de restricció en qualsevol laboratori que es treballi i no disposi de facilitats per realitzar seqüenciació.

Un aspecte interessant que cal destacar és que Mavrodi i col. (2001) van observar una relació entre els resultats obtinguts amb la tècnica BOX-PCR (de caracterització genotípica global de la totalitat del genoma) i amb RFLP-*phlD*. Amb l'anàlisi MRFLP-PFGE emprada en el nostre treball no s'ha observat aquesta relació, mentre que amb els RFLP-rDNA si que s'obtenia una bona relació amb els RFLP-*phlD*.

El locus responsable de la síntesi del 2-4 diacetilfloroglucinol conté el gen *phlD*, que és un gen peculiar en el món bacterià. El producte del gen és una proteïna que comparteix una gran homologia amb sintetases de plantes que són rares en bacteris, fet pel qual s'ha suggerit que poden tenir un origen evolutiu comú o que representin un cas d'evolució convergent en enzims clau involucrats en la biosíntesi de metabòlits secundaris (Bangera i Thomashow 1999, Ramette i col. 2001). Aquest gen ha estat emprat com a marcador genètic per detectar bacteris productors de Phl ja que la seva presència es correlaciona amb la producció de floroglucinol *in vitro* (Raaijmakers i col. 1997). Tant els RFLP com la seqüenciació del gen mostren les mateixes agrupacions de soques en relació a la producció dels metabòlits Phl i Prn comentat amb anterioritat, i això és extensiu tant en les anàlisis realitzades en les soques seqüenciades en el nostre treball com en la totalitat de seqüències de soques disponibles.

Per a les 4 soques aïllades i estudiades en el nostre treball, s'observa tant en els RFLPs com en la seqüenciació que es distingeixen 2 grups: el primer format per la soca EPS812 i el segon per la resta de soques (EPS807, EPS808 i EPS818) totes aïllades de portaempelts de fruiters. Que soques aïllades de la mateixa procedència i que s'han mostrat diferents amb tècniques com MRFLP-PFGE tinguin igual seqüència en el gen *phlD* podria ser degut a la transferència horitzontal del gen entre soques. En aquest sentit, Picard i col. (2000) van obtenir resultats semblants quan després d'haver aïllat una soca portadora del gen *phlD*, que van classificar com a enterobacteria, i amb la posterior seqüenciació del gen, es va observar una similitud molt elevada en la seqüència respecte a la d'una soca de *Pseudomonas* aïllada del mateix lloc.

En l'anàlisi filogenètica de les seqüències del gen *phlD*, s'ha treballat amb un total de 23 seqüències de les que 13 s'han determinat en el nostre treball i la resta s'han obtingut del GenBank. Hi ha 3 grups de soques que han presentat un 100 % de similitud entre elles: un format per *P. fluorescens* WB1 i WB52, un altre per EPS807, EPS808 i EPS817, i un altre per *P. fluorescens* Q4-87, enfront la seqüència de referència Q2-87. Per a la realització de l'estudi filogenètic solament es va emprar una soca representant d'aquests grups. Cal esmentar que cada un dels tres grups de soques havien estat aïllats del mateix sistema i, per tant, el resultat obtingut era d'esperar.

En les seqüències dipositades en el GenBank, es trobaven dues seqüències de la soca *P. fluorescens* CHA0, que també s'ha seqüenciat en el nostre treball. A partir de l'alineament de les tres seqüències, s'ha comprovat que solament difereixen en una base que en un dels casos i en la nostra seqüència correspon a una citosina mentre que en el tercer cas hi ha una timina. Aquest fet pot ser degut a una errada de lectura de la seqüència o bé a un canvi real que s'hagi produït a l'anar subcultivant la soca al laboratori. En el nostre cas, la seqüenciació es va portar a terme en els dos sentits de la cadena per tal d'evitar errades de lectura que poguessin ser dubtoses.

Solament s'ha publicat un estudi realitzat amb les seqüències de 7 de les soques que també s'han inclòs en el nostre treball i que estaven dipositades en el GenBank (Ramette i col. 2001). Aquests autors van observar 223 nucleòtids polimòrfics del total de les 745 pb de la seqüència, mentre que en el conjunt de les 23 soques del nostre treball se n'han obtingut 252 del total de 664 pb analitzades. Per tant, l'índex de diversitat molecular dins el gen ($p = 0.12662 \pm 0.01649$) és més elevat en el nostre treball que en el de Ramette i col. (2001). Això es degut a que nosaltres vàrem incloure 16 soques més i alguna d'elles com la EPS317 presenta una seqüència molt divergent de tota la resta. El principal factor que afecta el valor d'aquesta diversitat és la gran divergència entre les seqüències dels dos grans grups formats per les soques semblants a la CHA0 i a la Q2-87 utilitzades com a referència. Cal destacar que dins cada una de les agrupacions obtingudes en els arbres filogenètics l'homologia de la seqüència és elevada, però hi ha una gran separació entre els dos grups principals descrits (soques de referència Q2-87 i CHA0). És interessant remarcar que dintre el grup minoritari de soques amb seqüències semblants a la de CHA0 s'hi troba la soca EPS317 que queda tant aïllada d'un grup com l'altre. Aquesta soca ha mostrat en totes les anàlisis ser molt peculiar i quedar separada de la resta de soques tant amb RFLP-rDNA, MRFLP-PFGE i RFLP-*phlD*.

Capítol 5: Anàlisi polifàsica

5.1 Introducció

5.1.1 Anàlisi polifàsica

Vàries soques de *Pseudomonas* que pertanyen al grup fluorescent actuen com a agents de biocontrol (ACB) de malalties fúngiques i bacterianes de diverses plantes. Fins al moment, el mecanisme que ha atret majoritàriament l'atenció dels investigadors ha estat l'antibiòsi degut a la producció de metabòlits com cianhídric (HCN) (Voisard i col. 1989), fenazines com l'àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) (Thomashow i Weller 1988), floroglucinols (Phl) (Fenton i col. 1992), pioluteorina (Plt) (Kraus i Loper 1995) i pirrolnitrina (Prn) (Pfender i col. 1993). Malgrat el coneixement adquirit en relació a l'antibiòsi, aquest no és l'únic mecanisme que intervé en l'habilitat d'un microorganisme per actuar com a ACB d'una determinada malaltia. Hi ha altres mecanismes diferents de l'antibiòsi com són la inducció de resistència en l'hoste, la competició per nutrients i l'exclusió del nínxol ecològic que actuen en les complicades relacions que s'estableixen entre els components que intervenen en el procés de biocontrol.

Actualment les estratègies de selecció d'ACBs estan basades en el treball empíric d'assaig i selecció de potencials ACB i no difereixen gaire dels emprats en els darrers 25 anys. Un dels objectius en els estudis actuals sobre biocontrol rau en poder establir quines característiques podrien ser emprades per a distingir les soques que són efectives en el biocontrol de les que no ho són.

Probablement, la primera qüestió que s'ha de plantejar en aquest sentit és saber si els ACBs pertanyents a una espècie bacteriana concreta comparteixen característiques fenotípiques i genotípiques comuns (Ellis i col. 2000, Berg i col. 2000). També s'ha suggerit la mateixa qüestió en relació als bacteris que actuen com a promotors del creixement en plantes (BPCP) que podrien compartir característiques relacionades amb la capacitat d'establir interaccions planta-microorganisme específiques (Pierson III i Pierson 1996).

Fins al moment, els agents de biocontrol han estat seleccionats a partir d'un gran nombre d'aïllats (generalment milers) mitjançant la realització directa d'assajos de control de la malaltia. Aquesta selecció que ha mostrat ser efectiva en alguns casos, presenta un seguit d'inconvenients com són l'alt cost econòmic i la inversió de temps necessari per a l'obtenció dels resultats. S'ha d'afegir a aquests inconvenients de les primeres fases de selecció, el llarg procés a que s'ha de sotmetre l'ACB seleccionat pel que fa referència a assaigs a camp, formulació, escalat en la producció i

finalment la posterior comercialització, que provoquen que en conjunt el desenvolupament d'un ACB tingui una durada de temps excessivament llarga (Matthre i col. 1999, Harman 2000).

D'ença l'any 1970, quan R.R.Colwell va introduir el terme "taxonomia polifàsica" amb l'objectiu d'integrar dades fenotípiques, genotípiques i filogenètiques en la taxonomia dels microorganismes, nombrosos autors utilitzen la integració d'aquestes dades no solament amb un objectiu taxonòmic, sinó per a la realització d'estudis intraespecífics en diferents grups de bacteris causants de malalties dels vegetals (Bouzar i col. 1999).

Si bé alguns treballs han estat encaminats a cercar aproximacions moleculars per tal d'assistir en la selecció d'agents de biocontrol, són pocs els publicats dels que nosaltres tenim coneixement. Per exemple, Shena i col. (2000), van emprar tècniques moleculars basades en el DNA en un grup de llevats amb l'objectiu de distingir determinades soques entre aïllats que fenotípicament eren indistingibles o molt semblants, i alhora, poder descartar de les proves sobre activitat biocontroladora les soques que eren idèntiques. En el cas de bacteris cal destacar el treball realitzat per Berg i col. (2000) en el que es van aïllar 300 soques a partir de dos varietats de plantes de maduixera i dues localitzacions geogràfiques. Un cop els autors van realitzar la selecció *in vitro*, es van escollir 20 aïllats procedint a realitzar els perfils fisiològics i les empremtes de DNA. Van obtenir 4 aïllats ben diferenciats per les posteriors proves *in vivo*. Aquest és un dels pocs treballs on es va observar una bona relació entre les característiques genotípiques i fenotípiques així com entre els resultats entre l'antagonisme *in vitro* i la capacitat d'inhibició *in vivo* de la malaltia causada per *Verticillium*.

El que realment és important però, és esbrinar si hi ha relacions entre les característiques fenotípiques i genotípiques en soques bacterianes que actuen com a ACBs i BPCPs. En el cas d'existir, això permetria poder realitzar una selecció assistida de possibles candidats en posteriors prospeccions. L'establiment de relacions entre característiques diferencials (bé siguin fenotípiques o genotípiques) entre els ACBs i BPCPs enfront la resta de soques d'una mateixa espècie, permetria un estalvi de recursos i de temps considerable en noves prospeccions.

Ellis i col. (2000) van treballar amb un total de 29 soques del grup fluorescent de *Pseudomonas*, algunes de les quals ja havien estat caracteritzades com a agents de biocontrol per altres autors. Aquests van realitzar una caracterització fenotípica a nivell de comparació dels patrons d'utilització de fonts de carboni, antagonisme *in vitro* i biocontrol *in planta* (pèsol) envers *Pythium ultimum*, la producció de metabòlits secundaris (HCN i PCA a nivell de detecció de gens per la Plt i el PhI), i a nivell molecular van caracteritzar el perfil d'àcids grassos i ribotipat. Els resultats que van obtenir van mostrar que un percentatge alt de l'àcid gras ciclopropà C17:O 17CFA en l'extracte total de l'anàlisi FAME i la producció de HCN es correlacionaven de manera significativa amb l'antagonisme *in vitro* i el biocontrol *in planta* de *Pythium ultimum*. El potencial del contingut de

C17:O 17CFA com a marcador per a seleccionar noves soques actives va ser demostrat amb l'aïllament d'una nova soca que tenia una activitat de biocontrol equivalent a les soques que s'havien obtingut amb mètodes de selecció tradicionals, i per tant es podia considerar com un marcador molecular associat a la capacitat de biocontrol de *Pythium*.

Malauradament, no hi ha altres treballs publicats on s'hagi portat a terme un plantejament semblant al d'Ellis i col. (2000) i el nostre propi treball. Cal tenir en compte que aquestes relacions s'han d'establir tenint el resultat de suficients caracteritzacions (fenotípiques i/o genotípiques) i entre un nombre apropiat de bacteris que siguin molt diversos en relació a l'origen i al seu comportament com a ACB per poder estar segurs de la interpretació de les relacions.

En el nostre treball, en la realització dels capítols 3 i 4, s'han generat un nombre considerable de dades en referència a característiques fenotípiques i genotípiques, que poden ser emprades en aquest capítol per determinar les relacions entre les diferents característiques.

5.1.2 Objectius

L'objectiu principal d'aquest capítol és la realització d'una anàlisi polifàsica d'un grup de 72 soques de *Pseudomonas* per a determinar si existeixen marcadors genètics o fenotípics que puguin ser emprats en una estratègia assistida de selecció de soques amb activitat en el control biològic (ACBs) enfront *S. vesicarium* (taca marronosa de la perera); *E. amylovora* (foc bacterià de la perera i pomera) i *P. expansum* (podridura blava de pomes i peres), així com de bacteris promotors del creixement en portaempelts de fruiters (BPCPs).

Per assolir aquest objectiu s'ha portat a terme una anàlisi múltiple de correspondències, de correlacions bivariades i de freqüències de variables categòriques utilitzant característiques fenotípiques (identificació a nivell d'espècie, producció de metabòlits, antagonisme *in vitro*, inhibició d'infeccions *in vivo* i promoció del creixement en portaempelts) i genotípiques (RFLP-PCR-rDNA).

5.2 Material i mètodes

5.2.1 Dades emprades

Les dades emprades en aquest capítol són les obtingudes en els capítols 3 i 4 d'aquest treball consistents en la caracterització de les soques a nivell fenotípic (classificació a nivell d'espècie, producció de diversos metabòlits, antagonisme *in vitro*, inhibició de la infecció *in vivo* i promoció del creixement en plantes) i genotípic. En aquest darrer cas, solament s'han emprat els resultats dels patrons de restricció genòmica del rDNA amplificat per PCR amb els 4 enzims *HaeIII*, *NdeI*, *TaqI* i *RsaI* emprats de manera individual.

5.2.2 Anàlisi estadístic

L'anàlisi s'ha portat a terme amb les 72 soques i en un grup seleccionat de 57 soques. El motiu d'aquesta selecció de 57 soques va venir donat pel fet que en la caracterització genotípica mitjançant els patrons de macrorestricció genòmica resolts amb electroforesi de camp polsant, els resultats van mostrar que hi havia soques que eren genèticament idèntiques. Per aquest motiu i amb l'objectiu de verificar la influència que podia tenir l'ús de soques genèticament idèntiques en les anàlisis que es volien fer es va decidir realitzar la mateixa anàlisi traient les soques que havien mostrat igual patró de MRFLP-PFGE.

Les soques de les que es va prescindir en la segona aproximació analítica van ser CFBP2126, WB1, Q₄₋₈₇, EPS209, EPS356, EPS373, EPS537, EPS807, EPS808, EPS809, EPS813, EPS814, EPS815, EPS816, EPS1024 i EPS1025.

Anàlisi de correspondències

Per posar de manifest les relacions entre les característiques de les soques amb l'eficàcia de biocontrol d'*Erwinia amylovora*, *Penicillium expansum* i *Stemphylium vesicarium* i la promoció del creixement en els portaempelts Marianna i GF677, es va realitzar una anàlisi multivariable de correspondències emprant el procediment CORRESP del paquet d'aplicacions SAS (PROC CORRESP MCA, SAS Institute, Inc).

L'anàlisi de correspondències és una tècnica d'anàlisi de components principals entre variables categòriques que representa les associacions entre les files (soques) i les columnes

(característiques) com un punt en un espai euclidi. La posició d'aquest punt ve determinada per les freqüències trobades en les diferents cel·les.

La interpretació de l'anàlisi múltiple de correspondències es basa en la relació entre els punts trobats en la mateixa direcció envers l'origen i en la mateixa regió de l'espai. La distància entre els punts no té tant de pes en la interpretació com en l'anàlisi simple de correspondències.

Les variables considerades en l'anàlisi van ser:

- 1- La identificació de les 72 soques a nivell d'espècie amb l'ús de galeries API. Es van considerar les soques classificades com a *P. fluorescens* amb aquest mètode envers les identificades com a *P. putida* o amb identificacions dubtoses dins altres espècies (p.e. *P. pseudomallei*).
- 2- La capacitat antagonista de les soques amb les categories antagonisme i no antagonisme enfront diferents patògens (*P. syringae* pv. *syringae*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, *Penicillium expansum* i *Stemphylium vesicarium*) en diversos medis de cultiu dependent del patògen assajat (B de King (KB), Glucosa Asparagina (GA), els dos medis KB i GA amb ferro, Luria Bertani (LB) i Agar Patata-Dextrosa (PDA)). Les combinacions de patògen indicador i medi emprat s'han especificat en el capítol 3.
- 3- La producció dels metabòlits floroglucinol (PhI), Pirrolnitrina (Prn), àcid fenazin-1 carboxílic (PCA), quitinases, àcid-3-indolacètic (IAA) i cianhídric (HCN) segons les categories de productores i no productores.
- 4- L'eficàcia de la inhibició de les infeccions causades per *S. vesicarium* en bioassaig de fulles de perera, de *P. expansum* en pomes i d'*E. amylovora* en fruits immadurs de perera. Les categories que es van tenir en compte van ser la inhibició de la infecció positiva quan l'eficàcia era superior al 70 % en *S. vesicarium*, al 60 % en *P. expansum* i al 74 % en *E. amylovora* i la no inhibició de la infecció quan l'eficàcia era inferior als valors comentats.
- 5- L'activitat promotora de creixement en portaempelts de prunera (Marianna 2426) i l'híbrid presseguer x ametller (GF677). Es van considerar promotores si assolien un índex relatiu d'eficàcia superior a 2 en Marianna 2624 i a 1.5 en GF677.
- 6- La caracterització genotípica (Capítol 4) mitjançant RFLPs-rDNA amb els enzims *HaeIII*, *TaqI*, *NdeI* i *RsaI*. Es van definir tres categories en relació a la seva posició en les agrupacions dels dendrogrames. Amb l'enzim *HaeIII* es van classificar els patrons fins al nº 3 (baix), del 3 al 6 (mitjà) i superiors a 6 (alt). Amb *TaqI*, fins al nº 4 (baix), del 4 al 8 (mitjà) i superiors a 8 (alt).

Amb *Ndel* fins al nº 2 (baix), del 2 al 4 (mitjà) i superior a 4 (alt). Amb *Rsal* es van definir solament 2 categories, inferior o igual a 5 (baix) i superior a 5 (alt).

Anàlisi de correlacions bivariades

Les correlacions es van estudiar entre parelles de característiques mitjançant el procediment de correlacions bivariades que calcula el coeficient rho d'Spearman amb els seus nivells de significació. Aquest coeficient de correlació és una mesura de l'associació entre dues variables i pot assolir valors de -1 a +1 (relació negativa i positiva, respectivament). Per a la realització de l'anàlisi de correlació es van transformar les dades en rangs, premissa indispensable pel càlcul de rho.

Les dades emprades van ser les mateixes que en l'anàlisi de correspondències, amb l'excepció de les provinents de la caracterització genètica al no tenir sentit la transformació en rangs. Es va considerar l'antagonisme com a la suma dels valors obtinguts en els diferents medis assajats per a cada un dels patògens. Pel càlcul del coeficient de correlació rho d'Spearman es va emprar el programa SPSS (versió 7.5.2 SPSS Inc. 1989-1997).

Malgrat que el coeficient rho d'Spearman mesura l'associació entre ordres de rangs, s'ha de tenir cura en la interpretació de les correlacions significatives ja que s'ha d'evitar extreure conclusions sobre relacions causa/efecte a partir dels coeficients obtinguts.

Anàlisi de freqüències de variables categòriques

Per determinar les relacions entre les variables dependents (biocontrol en bacteris i fongs i promoció del creixement en portaempelts) envers les variables independents (producció de metabòlits i antagonisme) es va emprar el procediment CATMOD del paquet d'aplicacions SAS (PROC CATMOD, SAS Institute, Inc).

El procediment CATMOD ajusta models lineals en funció de les freqüències de les observacions. En el nostre cas les variables de resposta es van escalar en dos nivells en el cas del biocontrol i en tres nivells en el cas de la promoció del creixement. La resposta a la promoció del creixement es va considerar positiva (si els índexs eren superiors a 2 en Marianna i 1.5 en GF677), negatives si eren menors que un índex 1 i neutres si oscil·laven entre 1 i per sota els llindars considerats positius.

Pel que fa a les variables independents es van considerar sempre 2 nivells de resposta, producció

i no producció del metabòlit i antagonisme positiu i inexistent.

Els programes emprats en l'anàlisi PROC CORRESP MCA i PROC CATMOD es presenten en l'annex 5.

5.3 Resultats

Anàlisi de correspondències

Per estudiar les relacions que hi ha entre l'antagonisme *in vitro* enfront bacteris i fongs fitopatògens, la producció de diferents metabòlits, els patrons de restricció d'una part de l'operó ribosomal (RFLP-rDNA) obtingut amb diferents enzims, la inhibició de la infecció per *Erwinia amylovora*, *Stemphylium vesicarium* i *Penicillium expansum* així com en la promoció del creixement en els portaempelts de prunera Marianna 2624 i l'híbrid de presseguer i ametller GF677, es va realitzar una anàlisi multivariable de correspondències.

En les figures 5.1 i 5.2 es mostra la projecció de cadascuna de les categories de cada variable en una representació gràfica tridimensional i en una projecció en dues dimensions. El tractament de les dades emprant la totalitat de les 72 soques (Figura 5.1) considerades com a grup A i de les 57 soques, considerades com a grup B (Figura 5.2), mostra que les tres primeres dimensions expliquen el 38.77 % del total de la variància pel grup A i el 36.62 % pel grup B. A la taula 5.1 s'indica el percentatge de variància per a cada una de les tres primeres dimensions obtingut en l'anàlisi multivariable de correspondències relatiu al tractament de les dades del grups de soques A i B.

Taula 5.1 Contribució a la variància de cada una de les tres primeres dimensions obtingudes amb l'anàlisi PROC CORRESP MCA amb els dos grups de soques A i B definides en el text.

Table 5.1 Contribution to the first, second and third dimensions to the variance obtained with PROC CORRESP MCA analysis for the two groups A i B of strains defined in text.

Dimensió	Variància (%)	
	Grup A (72 soques)	Grup B (57 soques)
1	23.52	20.71
2	8.72	9.19
3	6.52	6.72
Total	38.77	36.62

En el cas del grup A, la dimensió 1, representada per l'eix d'ordenades està definida per les variables antagonisme i producció dels metabòlits cianhídric (HCN) i floroglucinol (Phl). A la part positiva de l'eix de la primera dimensió se situen l'absència d'antagonisme ent envers els fongs *S. vesicarium* i *P. expansum* i enfront el bacteri *E. amylovora* en medis rics en ferro i en tots els medis en el cas de la resta de bacteris indicadors, així com la no producció dels metabòlits HCN i Phl.

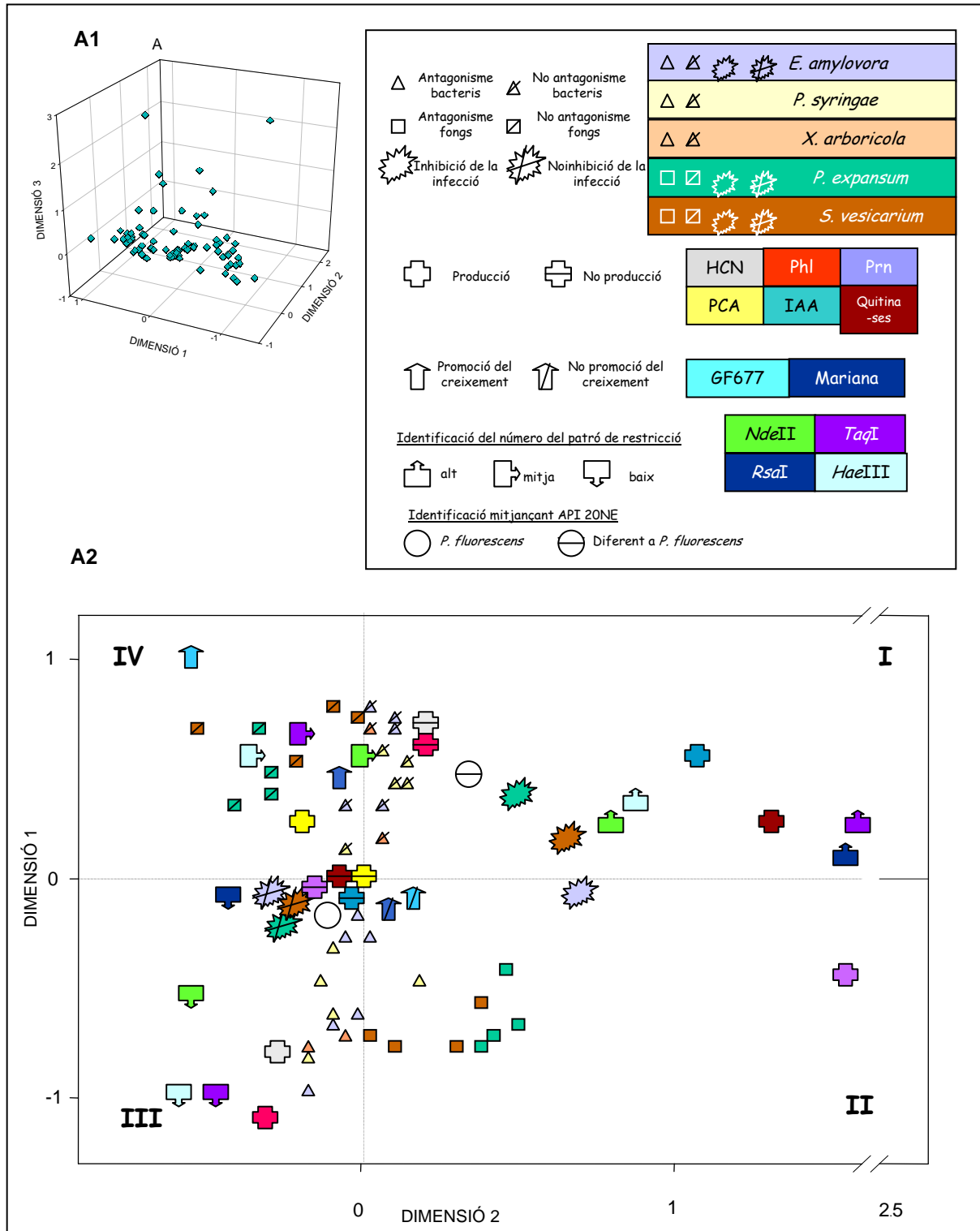


Figura 5.1 Representació de l'anàlisi múltiple de correspondències en una gràfica en tres dimensions (A1) pels tres primers components principals i en una projecció en dues dimensions (A2) dels dos components primers principals, corresponents a l'anàlisi de les 72 soques.

Figure 5.1 Principal component analysis plotted in a three-dimensional plot (A1) for the first three principal components and in a two dimensional plot (A2) for the two principal components including the 72 strains studied.

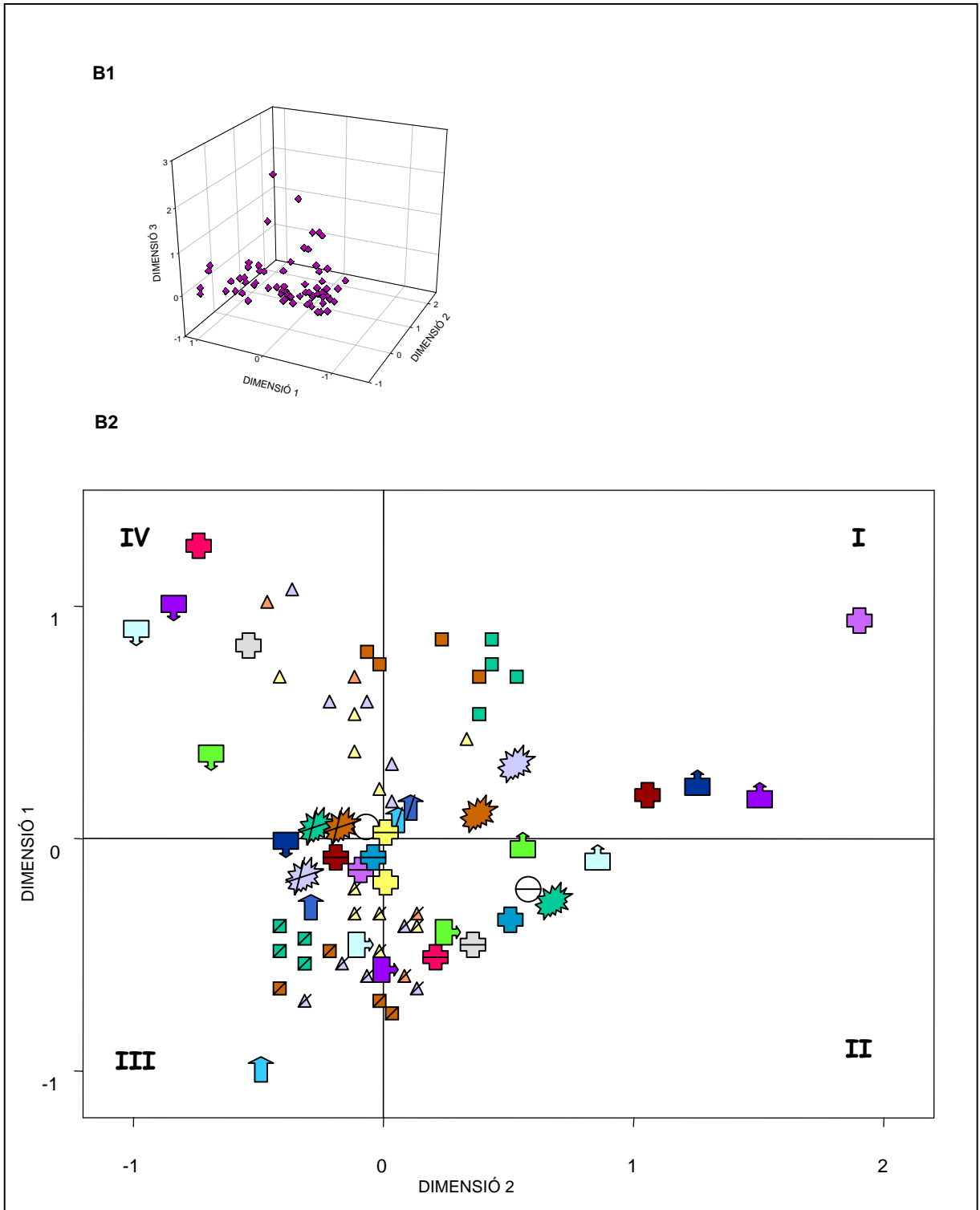


Figura 5.2 Representació de l'anàlisi múltiple de correspondències en una gràfica en tres dimensions (B1) pels tres primers components principals i en una projecció en dues dimensions dels dos components primers principals (B2) corresponents a l'anàlisi del grup seleccionat de 57 soques.

Figure 5.2 Principal component analysis plotted in a three-dimensional plot (B1) for the first three principal components and in a two dimensional plot (B2) for the two principal components including the 57 strains selected.

A la part negativa de l'eix d'ordenades se situen aquestes mateixes variables amb les categories d'antagonisme positiu i producció de metabòlits.

La segona dimensió representada per l'eix d'abscisses està definida per les variables antagonisme vers fongs en medis pobres en ferro, inhibició de la infecció d'*E. amylovora*, els patrons de restricció del rDNA i la producció del pirrolnitrina (Prn). En la part positiva de l'eix se situen els patrons amb números alts dels RFLP-rDNA amb els 4 enzims de restricció, la producció de Prn junt amb les categories positives de la inhibició de la infecció d'*E. amylovora* i l'antagonisme positiu en fongs en medis pobres en ferro. En la part negativa de l'eix se situen les mateixes variables en les categories de no producció de metabòlits, no inhibició de la infecció, no antagonisme i els patrons baixos dels RFLP-rDNA.

En la tercera dimensió se situen en la part positiva de l'eix l'antagonisme vers bacteris en medis rics en ferro, la producció de quitinases i àcid fenazina-1-carboxílic (PCA), la inhibició de la infecció per *P. expansum* i la promoció del creixement en el portaempelts Marianna 2624. Les categories positives es troben en la part positives de l'eix mentre que les categories negatives es troben en la part negativa de l'eix.

Quan s'utilitza el grup de soques B (no tenint en compte les soques que s'han mostrat idèntiques mitjançant MRFLP-PFGE), els resultats de les variables que defineixen la dimensió 1 són pràcticament els mateixos, però sí que s'observa el canvi d'algunes variables que influeixen en l'establiment de les dimensions 2 i 3. Per exemple, les quitinases intervenen en la definició de la dimensió 2 en lloc de la 3 i la promoció del creixement en GF677 es troba en la tercera dimensió en lloc de la de Marianna.

En la representació gràfica de l'anàlisi al comparar els grups de soques A i B (figures 5.1 i 5.2) s'observa que les categories de les variables relacionades amb les dimensions 2 i 3 es mantenen en els dos gràfics en la mateixa part de l'eix però en canvi en la dimensió 1 les categories es situen en el costat contrari de l'eix (gir de 180° de la gràfica).

Evidentment, hi ha variables que determinen una certa influència en l'establiment de les tres dimensions i d'altres que no hi contribueixen. En els dos grups de soques (A i B) les variables comuns que no mostren influència són la classificació per l'API i la inhibició d'infeccions d'*S. vesicarium*. En canvi la producció d'IAA i la promoció del creixement en GF677 tampoc mostren influència en el grup A mentre que en el B no influeixen la producció de Prn i la promoció del creixement en Marianna 2624.

Si es considera el grup de soques en la seva totalitat, grup A, s'observa que en la part positiva dels dos eixos definits per les dimensions 1 i 2 (quadrant I) se situa la inhibició de la infecció de fongs (*S. vesicarium* i *P. expansum*), l'antagonisme inexistent en bacteris, no producció de Phl i

HCN, RFLPs-rDNA alts i producció d'IAA i quitinases. Observant el segon quadrant en el sentit de les agulles del rellotge (la part negativa de la primera dimensió i positiva de la segona dimensió, quadrant II) se situa la inhibició d'infeccions per *E. amylovora* relacionada amb l'antagonisme en fongs i amb la producció de pirrolnitrina. En el quadrant III (part negativa de les dues dimensions) hi ha situat l'antagonisme positiu vers bacteris, i la producció de Phl i HCN que estan relacionats amb els patrons RFLP-rDNA baixos. Finalment, en el quadrant IV s'hi troben la promoció del creixement en Marianna 2624 i GF677 relacionat amb l'antagonisme negatiu vers fongs, patrons mitjos de RFLP-rDNA i producció de PCA.

Si s'observa la figura 5.2 (corresponent al grup de soques B) en la mateixa orientació que la figura 5.1, s'obtenen les següents conclusions. En el primer quadrant, la inhibició d'infeccions d'*E. amylovora* i *S. vesicarium* es relaciona amb l'antagonisme positiu vers fongs, producció de quitinases i pirrolnitrina i patrons alts dels RFLP-rDNA amb els enzims *Nde* II i *Taq* I. En el segon quadrant la inhibició de la infecció de *P. expansum* es relaciona amb la manca d'antagonisme vers bacteris en medis rics en ferro, no producció de Phl i HCN, producció d'IAA i patrons mitjos de *Nde* I i alts de *Hae* III. En el tercer quadrant, la promoció del creixement en GF677 i Marianna 2624 es relaciona amb l'antagonisme inexistent principalment vers fongs i patrons mitjans dels RFLP-rDNA de *Hae* III i *Taq* I. Finalment, en l'últim quadrant es relaciona l'antagonisme positiu vers bacteris amb producció de Phl i HCN i RFLP-rDNA baixos amb *Hae* III i *Taq* I i *Nde* II.

Si comparem el resultat de les anàlisis entre el grup A i B es pot apreciar que es manté que la inhibició d'infeccions causades per *E. amylovora* es relaciona amb l'antagonisme positiu vers fongs i producció de Prn, però hi ha diferents associacions amb els patrons de restricció i la producció d'altres metabòlits com les quitinases. Pel que fa a la inhibició de les infeccions de *P. expansum* en ambdues anàlisis es relaciona amb l'antagonisme inexistent en bacteris, no producció de Phl i HCN, producció d'IAA i patrons alts RFLP-rDNA amb els enzims *Taq* I i *Nde* II. En la inhibició d'infeccions per *S. vesicarium* solament és manté relacionat en les anàlisis tant del grup A com el B, la producció de quitinases. Mentre en el grup A la no producció de Phl, HCN i producció d'IAA es relaciona amb l'antagonisme inexistent en bacteris, en el grup B aquests estan relacionats amb l'antagonisme positiu vers fongs. Pel que fa referència als resultats en la promoció del creixement en els 2 portaempelts assajats, en ambdós grups de soques (A i B), aquest es relaciona amb l'antagonisme inexistent vers fongs i amb patrons mitjans de *Hae* III i *Taq* I, sobre tot en el cas de Marianna 2426.

Anàlisi de correlacions bivariades

Per establir la relació entre la inhibició de la infecció en material vegetal i la promoció de creixement en portaempelts amb les característiques estudiades de les soques, també es va

portar a terme el càlcul del coeficient de correlació rho d'Spearman, que compara les característiques per parelles de variables a fi de construir una taula de correlació.

A la taula 5.3 es mostren les matrius de correlacions obtingudes entre les variables considerades (solament es mostren aquells valors pels que el nivell de significació és superior al 95%). A la taula 5.4 es recullen els coeficients de correlació rho d'Spearman que estan relacionats amb la inhibició de la infecció causada per *E. amylovora*, *P. expansum* i *S. vesicarium* i amb la promoció del creixement dels portaempelts GF677 i Marianna 2624,

Taula 5.3 Coeficients de correlació rho d'Spearman per les diferents variables considerades. A, amb el total de les 72 soques; B, amb una selecció de 57 soques.

Table 5.3 Spearman rank correlation coefficients (rho) for the different traits studied. A; with the 72 strains; B, with selected 57 strains.

A	A.E.a	A.P.s	A.X.a	A.P.e	A.S.v	B.E.a	B.P.e	B.S.v	P.GF	P.Mar.	HCN	QUIT	IAA	PCA	Prn	Phl
A.E.a																
A.P.s	0,648*															
A.X.a	0,699*	0,473*														
A.P.e	0,458*	0,4*	0,412*													
A.S.v	0,631*	0,444*	0,462*	0,68*												
B.E.a	ns	ns	ns	ns	ns											
B.P.e	ns	ns	ns	ns	-0,24	ns										
B.S.v	ns	ns	ns	ns	ns	0,245	ns									
P.GF	ns	ns	ns	ns	ns	-0,301	ns	ns								
P.Mar.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,281	ns	ns							
HCN	0,546*	0,513*	0,369*	0,364*	0,455*	-0,24	-0,438*	-0,246	ns	-0,244						
QUIT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,272	ns	ns	ns	ns					
IAA	ns	ns	ns	ns	ns	0,275	ns	ns	ns	ns	ns	ns				
PCA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,359*	ns	ns	ns	-0,244	0,692*	0,304*			
Prn	ns	ns	ns	ns	ns	0,259	ns	ns	-0,266	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
Phl	0,701*	0,607*	0,461*	0,353*	0,631*	ns	-0,458*	-0,241	ns	ns	0,706*	ns	ns	ns	ns	ns

B	A.E.a	A.P.s	A.X.a	A.P.e	A.S.v	B.E.a	B.P.e	B.S.v	P.GF	P.Mar.	HCN	QUIT	IAA	PCA	Prn	Phl
A.E.a																
A.P.s	0,627*															
A.X.a	0,702*	0,457*														
A.P.e	0,434*	0,292	0,400*													
A.S.v	0,614*	0,316	0,474*	0,646*												
B.E.a	ns	ns	ns	0,272*	ns											
B.P.e	ns	ns	ns	ns	ns	ns										
B.S.v	ns	ns	ns	0,646*	ns	ns	ns									
P.GF	ns	ns	ns	ns	ns	-0,316	ns	ns								
P.Mar.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,265*	ns	ns							
HCN	0,461*	0,401*	0,344*	ns	0,347*	ns	-0,383*	ns	ns	0,294						
QUIT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns					
IAA	ns	ns	ns	ns	ns	0,289	ns	ns	ns	ns	ns	ns				
PCA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,377	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
Prn	ns	ns	ns	0,271	ns	0,263	ns	ns	-0,305	ns	ns	0,687*	0,296*	ns	ns	
Phl	0,631*	0,482*	0,412*	ns	0,546*	ns	-0,413*	ns	ns	ns	0,663*	ns	ns	ns	ns	ns

Es mostren els coeficients quan P>0.05; ns, correlacions no significatives a un nivell del 95% (P>0.05); *, indica P<0.01. A, antagonisme in vitro i B inhibició de la infecció en material vegetal en relació a E.a. (*E. amylovora*), P.s. (*P. syringae*), X.a. (*X. arboricola*); P.e. (*P. expansum*); S.v. (*S. vesicarium*). P; promoció del creixement en relació a GF, GF677; M, Marianna 2426. HCN, cianhídric; QUIT, quitinases; IAA, àcid 3-indolacètic; PCA, fenazina 1 carboxílic; Prn, pirrolnitrina, Phl, floriglucinol.

Coefficients are only given when P<0.05; ns, correlation not significant at level 95% (P>0.05); *, indicate P<0.01, A in vitro antagonism and B supression of infection in plant material in relation to E.a. (*E. amylovora*), P.s. (*P. syringae*), X.a. (*X. arboricola*); P.e. (*P. expansum*); S.v. (*S. vesicarium*). P. growth promotion in relation to GF, GF677; M, Marianna 2426. HCN, hydrogen cyanide; QUIT, chitinases; IAA, indole 3 acetic acid; PCA, phenazine-1-carboxylic acid; Prn, pyrrolnitrin, Phl, 2,4-diacetylphloroglucinol.

Taula 5.4 Selecció de coeficients de correlació d'Spearman relacionats amb la inhibició de la infecció i en la promoció del creixement amb nivells de significació superiors al 95%. Les abreviacions són les mateixes que en la taula 5.3.

Table 5.4 Selection of Spearman coefficients which were significant above 95% related to growth promotion and disease inhibition. Abbreviations are the same as table 5.3.

Activitat	Patogen/planta	Variable	Coeficient de correlació rho d'Spearman en els grups de soques	
			A	B
Inhibició de la infecció causada per	<i>E. amylovora</i>	HCN	-0.240	-
		IAA	0.275	0.289
		Prn	0.259	0.263
	<i>P. expansum</i>	ASv.	0.240	-
		HCN	-0.438*	-0.383*
		QUIT	0.272	-
		PCA	0.359*	0.377
		PhI	-0.458*	-0.413*
<i>S. vesicarium</i>	APe	-	0.646	
	HCN	-0.246	-	
	PhI	-0.241	-	
Promoció del creixement en	GF677	Prn	-0.266	-0.305
	Marianna 2624	HCN	-0.244	0.294

* indica $P < 0.01$

* indicate $P < 0.01$

Els coeficients de correlació més elevats estan sobre tot relacionats positivament entre la producció de PhI i HCN amb l'antagonisme en bacteris i fongs i alhora el màxim valor de correlació obtingut ($\rho = 0.706$) s'obté entre la producció de PhI i HCN. Deixant de banda les correlacions que es troben entre les variables antagonisme *in vitro* i producció de metabòlits, s'observa a la taula 5.4 que les correlacions significatives que tenen a veure amb la inhibició de la infecció dels tres patògens i la promoció del creixement en els dos portaempelts, majoritàriament es relacionen amb la producció de metabòlits.

La inhibició de la infecció d'*E. amylovora* es correlaciona en les anàlisis dels dos grups de soques (A i B) positivament amb la producció d'IAA i pirrolnitrina. En el grup A també es correlaciona negativament amb la producció de HCN i en canvi no ho és a un nivell significatiu en el grup B. En canvi, la inhibició de la infecció causada per *P. expansum* es correlaciona també en els dos conjunts de soques de manera negativa amb la producció de HCN i PhI i positivament amb la producció de PCA. En el grup A també hi ha una correlació positiva entre la inhibició de la infecció de *P. expansum* amb la producció de quitinases l'antagonisme *in vitro* d'*S. vesicarium*. Finalment, les correlacions que s'estableixen amb la inhibició de la infecció d'*S. vesicarium* si que són completament diferents en els dos grups de soques. Mentre en el grup A es correlaciona negativament amb la producció de PhI i HCN, en el grup B hi ha una correlació positiva amb

l'antagonisme *in vitro* enfront *P. expansum*.

En quant a la promoció del creixement, en el portaempelts GF677 aquesta es correlaciona negativament amb la producció de Prn en ambdós grups de soques (A i B), si bé el coeficient de correlació és més elevat en el grup B de soques. La promoció del creixement en Marianna 2624 també es correlaciona en els dos grups de soques amb la producció de HCN, si bé, amb el grup A ho fa negativament i en el grup B positivament.

Anàlisi de freqüències de variables categòriques

Per utilitzar el procediment CATMOD, es va procedir a posar les variables que es volia considerar dependents en funció de la resta de variables. L'objectiu era establir quina influència exercien variables relacionades amb la inhibició de la infecció de diferents patògens i la promoció del creixement.

Al ser aquest procediment una anàlisi que es basa en freqüències, pot succeir que en el cas de haver-hi un nombre insuficient de soques positives o negatives per una determinada variable, no es pugui portar a terme l'anàlisi. En el nostre treball, en el cas de la inhibició de la infecció causada pels tres patògens es van poder mantenir tots els nivells de les variables que es volien estudiar en el processament de les dades. En el cas de la promoció del creixement en els dos portaempelts no es van poder processar les dades corresponents la producció dels metabòlits quitinases, PCA i IAA perquè el model no podia completar l'anàlisi.

El model va ser significatiu en els dos grups de soques (A i B), per la inhibició de les infeccions causades per *E. amylovora* i *S. vesicarium*, així com per la promoció del creixement en els dos portaempelts. En el cas de la inhibició de la infecció per *P. expansum* el model no va ser significatiu. Solament es van obtenir algunes variables relacionades amb la inhibició de la infecció d'*Stemphylium vesicarium* i en la promoció del creixement del portaempelts Mariana 2624 amb un nivell de significació del 95% ($P < 0.05$).

A les taules 5.5 i 5.6 es mostren els resultats obtinguts en la inhibició de la infecció causada per *S. vesicarium* i la promoció del creixement en el portaempelts Marianna 2624 en els dos grups de soques considerats (A i B). A les taules és mostra a més dels resultats obtinguts, les respostes de les variables independents i de la variable dependent per tal de poder interpretar les dades de l'anàlisi. Atès que la suma de les influències de les variables ha de ser forçosament zero, el model solament dóna els valors parcials necessaris per a poder completar el resultat de les diferents respostes entre la variable dependent i les independents. Per exemple, en la taula 5.5, en el grups de soques A i B, amb un resultat d'influència de l'IAA de 1.89 (en A) i 1.79 (B), sent la resposta de la variable IAA "no producció del metabòlit" i en el que, la variable dependent es considerava en la categoria de "no inhibició de la infecció". El valor obtingut indica una relació positiva entre la no producció d'IAA i la no inhibició de la infecció, com la suma d'influències ha de ser zero, implica que la resposta de la producció d'IAA haurà de ser amb signe positiu a la resposta d'inhibició de la

infecció. En altres paraules, la producció d'IAA afecta positivament a la capacitat d'inhibir les infeccions en material vegetal.

Taula 5.5 Anàlisi de freqüències CATMOD en relació a la inhibició de la infecció causada per *S. vesicarium* en els dos grups de soques (A i B).

Table 5.5 CATMOD analysis in relation to infection inhibition of *S. vesicarium* in each strain group (A and B).

A Variable	Resposta de la variable independent	Resposta de la inhibició de la infecció	Influència	Error standard	Chi quadrat	Pr>Xisq
Phl	Np	Nb	0.6302	0.9089	0.48	0.4881
PCA	Np	Nb	1.1256	0.9509	1.4	0.2365
Prn	Np	Nb	-0.2419	1.0202	0.06	0.8125
IAA	Np	Nb	1.8894	0.9076	4.33	0.0374
HCN	Np	Nb	-0.9537	0.8032	1.41	0.2351351
A f	Si	Nb	-1.6583	0.7443	4.96	0.0259
A b	Si	Nb	1.30205	0.6600	3.9	0.0484

B Variable	Resposta de la variable independent	Resposta de la inhibició de la infecció	influència	Error standard	Chi quadrat	Pr>Xisq
Phl	Np	Nb	0.6819	0.8860	0.59	0.4415
PCA	Np	Nb	1.0862	0.9280	1.37	0.2418
Prn	Np	Nb	-0.3786	1.0288	0.14	0.7129
IAA	Np	Nb	1.7931	0.9029	3.94	0.0470
HCN	Np	Nb	-0.6996	0.7735	0.82	0.3657
A f	Si	Nb	-1.4468	0.7356	3.87	0.0492
A b	Si	Nb	1.0762	0.6735	2.55	0.1101

En negreta., $P < 0.05$. Nb; no inhibició de la infecció; Np, no producció del metabòlit; Si, antagonisme *in vitro* positiu. In bold letter, $P < 0.05$. Nb, no inhibition of pathogen infection; Np, no production, Si, *in vitro* antagonism positive,

Atenent a aquesta interpretació, els resultats mostren que en el cas de la inhibició de les infeccions d'*S. vesicarium* en ambdós grups de soques s'estableix una relació directe amb la producció d'IAA i amb l'antagonisme en fongs. S'observa també que en l'anàlisi del grup A s'hi estableix, a més, una relació inversa amb l'antagonisme *in vitro* enfront els bacteris. En altres paraules, la producció d'IAA i l'antagonisme *in vitro* enfront els fongs està relacionat amb una elevada probabilitat de que siguin soques capaces d'inhibir les infeccions d'*S. vesicarium*, i contràriament, l'antagonisme *in vitro* enfront els bacteris es relaciona inversament amb la capacitat de la inhoibició de les infeccions d'*S. vesicarium*.

En la taula 5.6, de la promoció del creixement en Marianna 2624, al haver considerat tres nivells de resposta, a la taula es mostren els resultats obtinguts en les dues primeres respostes de la variable dependent que corresponen a una sola resposta de la variable independent. En el cas de la variable Ab (antagonisme en bacteris), els resultats en les dos primeres respostes de la promoció (promoció i neutralitat) com són negatives, implica que la no promoció (o inhibició) ha de

presentar un signe positiu. És a dir, s'estableix una relació directa entre la manca d'antagonisme *in vitro* en bacteris i la promoció del creixement positiva o neutre en el portaampel·ls.

Taula 5.6 Anàlisi de freqüències CATMOD en relació a la promoció del creixement en el portaampel·ls Marianna 2624 en els dos grups de soques (A i B).

Table 5.6 CATMOD analysis in relation to growth promotion in the rootstock Marianna 2624 in each strain group (tables A and B1).

Grup A Variable	Resposta de la variable independent	Resposta de la promoció en Marianna 2624	influència	Error standard	Chi quadrat	Pr>CHisq
Phl	Np	+	0.4538	0.4388	1.07	0.3010
		0	0.5156	0.6009	0.74	0.3909
HCN	Np	+	-0.7815	0.4550	2.95	0.0859
		0	0.3148	0.5353	0.35	0.5564
A f	Si	+	0.1097	0.3870	0.08	0.7769
		0	0.2745	0.3815	0.52	0.4717
A b	Si	+	-0.9662	0.4123	5.49	0.0191
		0	-0.0455	0.4270	0.01	0.9152

Grup B Variable	Resposta de la variable independent	Resposta de la promoció en Marianna 2624	influència	Error standard	Chi quadrat	Pr>CHisq
Phl	Np	+	-0.0965	0.5023	0.04	0.8476
		0	-0.0130	0.7873	0.00	0.9868
HCN	Np	+	-0.6699	0.4648	2.05	0.1526
		0	0.8987	0.7333	1.50	0.2203
A f	Si	+	-0.0895	0.4117	0.05	0.8279
		0	0.1895	0.4009	0.22	0.6364
A b	Si	+	-0.9138	0.4246	4.63	0.0314
		0	-0.0904	0.4419	0.04	0.8378

En negreta, $P < 0.05$. Np, no producció del metabòlit; Si, antagonisme *in vitro* positiu; +, promoció del creixement positiu; 0 promoció del creixement neutre.

In bold letter, $P < 0.05$. Np, no production, Si, *in vitro* antagonism positive, +, positive growth promotion, 0, neutral growth promotion.

A la taula 5.6, queda reflectit que en el cas de la promoció del creixement del portaampel·ls Marianna 2624, en ambdós grups de soques solament es significatiu l'efecte inhibitor que té un antagonisme enfront bacteris.

5.4 Discussió

El baix nivell de similitud genètica entre les soques segons les anàlisis RFLPs-PCR-rDNA i MRFLPs-PFGE observat en aquest treball (Capítol 4) reflecteix una alta diversitat genotípica tant

en part de l'operó ribosomal com en la totalitat del genoma. Aquest resultat és semblant al obtingut per Rainey i col (1994) emprant els MRFLP-PFGE en soques de *P. fluorescens*, entre les que no hi havien soques d'interès com a ACBs i el d'Ellis i col. (2000) que van emprar el ribotipat en soques de *Pseudomonas* d'interès en biocontrol. En el cas del nostre treball i concretament en l'anàlisi RFLPs-PCR-rDNA del conjunt de soques, la elevada heterogeneïtat observada, està en concordança amb l'obtingut en l'anàlisi de la regió ITS de soques de *Pseudomonas* aïllades del sòl realitzat per Cho i Tiedje (2000), en un treball que no té relació amb el biocontrol. Això fa pensar que aquesta heterogeneïtat és intrínseca al gènere *Pseudomonas* independentment del tipus d'agrupació que s'utilitzi (origen, etc.).

La manca de relació entre les agrupacions genotípiques trobades en el nostre treball i la capacitat de les soques per ser o no ACBs s'ha d'interpretar com un reflex de la gran diversitat dins *P. fluorescens* tal i com ha estat citat per Ellis i col. (2000). Sembla que l'activitat com a ACB i com a BPCP pot arribar a ser una característica comú d'un grup general i genèticament molt divergent de microorganismes més que no una característica molt específica d'un grup petit i especialitzat de *Pseudomonas*.

Un dels objectius principals d'aquest capítol, va ser posar de manifest la discrepància o consistència dels resultats d'anàlisi multivariant que es poden obtenir en bases de dades de soques no depurades (grup A) o les del conjunt de 56 eliminant les que genèticament eren idèntiques (grup B). Amb les anàlisi genètiques portades a terme en el Capítol 4 es va posar de manifest que algunes de les soques eren genèticament idèntiques i per tant clons de la mateixa soca original, mostrant la importància que té el disposar d'una eina d'anàlisi genètic discriminatori a nivell de soca. El que es pretenia posar en evidència amb el tractament de les dades dels dos grups separadament era la influència que pot tenir en els resultats la presència de clons repetits de la mateixa soca i, per tant, indirectament, ressaltar la necessitat de depurar els grups de soques escollits en la realització de determinats anàlisi a fi d'evitar extreure resultats erronis. En aquest sentit, la tècnica dels MRFLP-PFGE ha mostrat ser capaç d'identificar els clons de la mateixa soca en el nostre treball gràcies precisament a l'alta heterogeneïtat dins l'espècie.

En les tres anàlisis estadístiques que s'han realitzat: anàlisi de correspondències, de correlacions bivariades i de freqüències de variables categòriques, s'ha posat de manifest la influència que exerceixen en els resultats la presència de clons de soques. Evidentment, hi ha alguns resultats que es mantenen en les anàlisis del grup A i B i d'altres que solament es mostren significatius en el grup A. Realment, els resultats que s'han de considerar són, al nostre entendre, els obtinguts amb el grup B, en els que l'absència de repeticions d'una mateixa soca fa que al tractar-se d'anàlisi de freqüències, no puguin esbiaixar les conclusions.

En aquest sentit, hi ha diversos treballs que probablement pateixen d'aquest problema. El fet de no haver aplicat una tècnica discriminatòria per a depurar la col·lecció, com l'anàlisi MRFLP-PFGE, fa que s'hagin d'avaluar amb cura els resultats de Borowicz i col. (1997) emprant una anàlisi RFLP-16S rDNA en 38 aïllats de *Pseudomonas* i 11 soques de referència, on van obtenir que 10 dels seus aïllats que mostraven el mateix patró de restricció i capacitat de biocontrol de malalties de cereals, i van suggerir que aquest patró podia ser un bon marcador genètic per a la cerca d'ACBs. Es podria plantejar, en relació a la seva interpretació dels resultats, la necessitat de saber si amb altres tècniques amb major nivell de discriminació, els 10 aïllats propis corresponien o no a clons de la mateixa soca ja que eren aïllats de la mateixa procedència. Com s'ha mostrat en el nostre treball en els aïllats de la sèrie 808, procedents tots de portaempelts comercials de fruiters del viver d'El Rebato, moltes vegades s'aïlla la mateixa soca tot i tractar-se de mostres diferents.

Com s'ha comentat en la introducció del present Capítol, solament tenim constància del treball d'Ellis i col (2000) que té el mateix plantejament que el nostre. Aquests autors van obtenir una bona correlació entre una elevada proporció del contingut de l'àcid gras ciclopropà (17CFA) en les soques de *Pseudomonas* i la inhibició de *Pythium ultimum*. En el seu cas, com el 17CFA per si sol no presenta propietats antimicrobianes, els va portar a postular que la proporció del contingut del 17CFA pot servir com a marcador fenotípic de possibles ACBs de *P. ultimum*. Si es té en compte que la síntesi del CFA està sota el control de *rpo S* en *E. coli*, probablement el nivell de 17CFA sigui indicador de l'expressió de gens implicats en l'expressió de metabòlits regulats pels reguladors de la fase estacionària com pot ser el factor sigma σ^S . Alhora, s'ha demostrat que hi ha varis al·lels per aquest factor que varien en l'expressió dels gens sota el seu control i, per tant, podria ser que l'augment detectat de la proporció de 17CFA indiqui la presència d'un al·lel molt eficient. Ellis i col. (2000) suggereixen que els metabòlits PhI, PCA i Prn potser no són en si mateixos els responsables de l'activitat de biocontrol sinó que indiquin quelcom desconegut relacionat. Aquesta idea també ha estat recentment citada per Mavrodi i col. (2001) en un treball realitzat en un conjunt de *Pseudomonas fluorescens* productores de floroglucinol. S'havia pensat que en aquestes soques, possiblement els diferents genotips es podien relacionar amb la quantitat d'antibiòtic produït i en l'eficiència de biocontrol. Al no obtenir aquest resultat Mavrodi i col. (2001) suggereixen que potser els diferents genotips són indicadors d'altres característiques que no es coneixen però que són molt importants en relació a la seva contribució en la supressió de la malaltia. Darrerament Raaijmakers i Weller (2001) han postulat que alguns genotips estan millor adaptats a la colonització d'arrels de diferents cultius indicant que possiblement es pugui millorar el biocontrol. Amb aquesta aproximació, s'hauria de realitzar la selecció d'una soca que sigui bona colonitzadora del conreu amb l'objectiu d'incrementar l'efectivitat en el biocontrol, sense haver d'augmentar la quantitat d'inòcul de la soca.

El treball d'Ellis i col. (2000) també va mostrar que en la interacció *Pythium ultimum*- agent de biocontrol, s'hi podia establir una correlació entre la producció de HCN i la supressió de la malaltia. De fet, es conegut que la producció de HCN incrementa l'exsudació de nutrients per part de la planta, factor que pot influenciar en la colonització de l'ACB. A més, s'han mostrat evidències que en alguns casos, la producció d'aquest HCN és un factor important en el biocontrol (p. ex. amb la soca CHA0, Voisard i col. (1989)). Cal però, tenir en compte el resultat de la correlació en el conjunt seleccionat d'aïllats, que ho havien estat per tenir en comú el fet de mostrar una bona capacitat de biocontrol de *Pythium*. Del total de les 29 soques emprades, una proporció elevada d'aquestes produïa HCN mentre que això no succeïa amb la resta de metabòlits. En el cas del nostre treball, si bé s'ha estudiat en un grup més ampli de soques i, a més, intentant incloure soques que no fossin agents de biocontrol, alhora que s'han incorporat soques capaces de produir altres metabòlits, ha succeït quelcom semblant. Tot i el dur treball realitzat per aïllar i identificar soques capaces de produir els antibiòtics PhI, PCA i Prn, solament es va aconseguir tenir una bona representació de les soques productores de PhI (que majoritàriament també produeixen HCN) i es van identificar poques soques productores de PCA (4) i Prn (1). En el cas de l'IAA i les quitinases, la proporció de soques productores és també baixa i per tant, tot i que alguna de les anàlisis que s'han portat a terme mostren una influència de la producció (o no producció) en la capacitat de biocontrol i la promoció del creixement, les anàlisis estadístiques no han estat prou significatives. Això fa pensar que s'hauria d'incloure un nombre suficientment gran de soques productores dels metabòlits PCA, IAA, QUIT i Prn, per estudiar adequadament la seva influència en la capacitat d'inhibició d'infeccions en material vegetal i en la promoció del creixement.

L'anàlisi de correspondències, tot i que és l'única metodologia que no té realment una significació estadística, sí que permet avaluar les relacions entre les diferents variables. Les posicions en les que es troben les variables de producció de metabòlits, queden una mica allunyades del conjunt de variables estudiades, possiblement degut a les proporcions relativament baixes de soques productores de PCA, Prn, quitinases i IAA.

Malauradament, cap de les anàlisis multivariants emprades en el nostre treball ha permès una diferenciació entre les soques capaces d'inhibir la infecció causada pels patògens assajats o promotores del creixement enfront de les que no ho són.

L'anàlisi de correspondències va relacionar la inhibició de la infecció causada per *Stemphylium vesicarium* amb l'absència d'antagonisme contra bacteris, la no producció de HCN i PhI i la producció d'IAA. En les correlacions bivariades (coeficient rho d'Spearman) el biocontrol d'*S. vesicarium* es correlacionava positivament amb l'antagonisme enfront *P. expansum*, i en l'anàlisi de freqüències (CATMOD) es relacionava positivament amb l'antagonisme en fongs i producció

d'IAA.

Quant a la inhibició de les infeccions causades per *E. amylovora* i *P. expansum* en l'anàlisi de correspondències es va relacionar amb la producció de Prn i quitinases. En les correlacions bivariades en el cas d'*E. amylovora* es relacionava positivament amb la producció d'IAA i Prn mentre que en *P. expansum* es relaciona negativament amb la producció de HCN i PhI i positivament amb la producció de PCA. En el cas de *P. expansum* el model de freqüències de variables categòriques no va ser significatiu, i en el cas d'*E. amylovora*, tot i ser significatiu el model, cap de les variables estudiades va mostrar una influència significativa.

Pel que fa referència a la promoció del creixement, en l'anàlisi de correspondències s'observa que es va relacionar positivament amb la manca d'antagonisme enfront als fongs i bacteris i la no producció d'IAA, Prn i quitinases. En les correlacions bivariades en el cas del portaempelts GF677 es relacionava negativament amb la no producció de Prn i en el cas de Mariana 2624 ho feia positivament amb la producció de HCN. Finalment, amb l'anàlisi de freqüències solament hi ha influències significatives en el cas del portaempelts Marianna 2624 en que l'antagonisme en bacteris influencia negativament la promoció del creixement.

En les malalties en que s'ha estudiat la inhibició de la infecció *in vivo*, s'ha pogut observar que en el nostre cas la producció de metabòlits actius *in vitro*, no explica l'activitat de biocontrol d'algunes de les soques que han mostrat ser molt actives. Aquest ha estat el cas de *P. fluorescens* M₄80-R i SBW25 que són capaces d'inhibir les infeccions en material vegetal enfront *P. expansum* i que contràriament no mostren antagonisme *in vitro*. En el cas de la promoció de creixement, els resultats experimentals també van mostrar que la soca M₄80-R era efectiva en la promoció del creixement en el portaempelts Marianna 2624.

Sorprenentment, la soca productora de PCA *P. fluorescens* 2-79 ha estat efectiva en la inhibició de la infecció dels tres patògens assajats, mentre que, dues de les nostres soques productores de PCA, les EPS895 i EPS945 sols ho són envers *P. expansum*. Aquest resultat concorda amb el citat per Kraus i Loper (1992) amb la soca *P. fluorescens* Pf-5 en la que no van poder demostrar la importància de la producció de PhI, Prn i Plt en el control de *Pythium* en cogombre.

S'ha de tenir en compte que en el cas de les soques amb activitat de biocontrol més estudiades, les productores de PhI, s'ha demostrat que tot i ser productores, els diversos genotips coneguts influeixen en la capacitat per suprimir *Fusarium* i *Pythium* en blat (Sharifi-Therani i col. 1998), per produir altres antibiòtics (Keel i col. 1996, Sharifi-Therani i col. 1998; Capítol 3 d'aquesta memòria) i en la capacitat de colonització de les arrels en funció de l'estadi de creixement del blat (Picard i col. 2000). Recentment, Raaijmakers i Weller (2001) han demostrat també que la capacitat de

colonització i manteniment de la població de soques productores de PhI no està relacionada amb el nivell de PhI produït, i que es relaciona amb l'adaptació de la soca a l'ecosistema on s'introdueix.

Per tots aquests motius, possiblement les diferències entre soques en la capacitat d'inhibició de les infeccions *in vivo* observades en el nostre treball, són fruit del resultat d'un conjunt de característiques que no hem estudiat. De fet, tal i com s'ha postulat des dels primers estudis sobre el biocontrol, l'èxit d'aquest és conseqüència de tot un conjunt de múltiples característiques de l'ACB.

En conclusió, les anàlisis multifactorials portades a terme en aquest capítol no han permès l'establiment de relacions, per al conjunt de característiques estudiades, que es mantinguessin consistents en les tres tècniques estadístiques emprades, entre la inhibició de la infecció causada per *patògens model* o la promoció de creixement amb les característiques fenotípiques i genotípiques de les esmentades soques.

Conclusions

- 1- Els encebadors emprats per a la recerca de bacteris que pertanyen al grup fluorescent de *Pseudomonas* portadors dels gens biosintètics del 2,4-diacetilfloroglucinol (PhI), àcid fenazin-1-carboxílic (PCA) dissenyats per Raaijmakers i col. (1997) i de Pirrolnitrina (Prn), dissenyats en el nostre treball, han estat efectius i fiables en la detecció del bacteris portadors en cultius purs i mostres naturals.
- 2- El nombre d'aïllats portadors dels gens biosintètics de PCA, PhI i Prn ha estat molt baix en la col·lecció de 418 soques integrada per soques de l'INTEA i aïllades en el nostre treball, procedents majoritàriament de la part aèria de fruiters (4 productors de PCA, 3 de PhI i 1 de Prn). La cerca assistida de productors de PhI, mitjançant marcadors fenotípics i posteriorment la utilització de tècniques moleculars (amplificació per PCR del gen *phlD*), ha estat el millor mètode en el tipus de mostres processades en el nostre treball, on la proporció de productors és relativament baixa. Aquesta cerca assistida ha permès identificar 12 nous aïllats portadors dels gens biosintètics de PhI procedents majoritàriament del sistema radical de plantes.
- 3- L'anàlisi de la longitud dels fragments de restricció dels amplificats per PCR dels gens biosintètics de PCA i PhI, ha mostrat l'existència de polimorfismes en la seqüència, i per tant, no s'ha pogut establir un sistema d'anàlisi de restricció dels amplificats per a la comprovació de la identitat del fragment amplificat. En el cas de la Prn, els enzims *Bgl* I i *Bsp*H I poden ser emprats per a la comprovació de la identitat del fragment obtingut per PCR.
- 4- Les soques portadores dels gens biosintètics de PhI (25), PCA (5) i Prn (5), a excepció de les soques *P. fluorescens* WB1 i WB52 (portadores dels gens implicats en la biosíntesi de Prn i PhI) produeixen efectivament el metabòlit corresponent en les condicions de laboratori assajades.
- 5- L'ús de les galeries API 20NE per a la identificació a nivell d'espècie dels aïllats de *Pseudomonas* del grup fluorescent, ha mostrat ser un mètode molt ràpid i efectiu, tot i que en alguns casos es fa necessària la utilització de proves bioquímiques addicionals per a assolir una correcta identificació.
- 6- El nombre de soques de *P. fluorescens*, sobre el total de les 70 estudiades, productores d'IAA (4) i quitinases (6) és baix, mentre que és molt elevat en el cas del HCN (32), que a més està associat a la producció de PhI.
- 7- L'antagonisme *in vitro* desenvolupat per les soques enfront els bacteris fitopatògens assajats depèn del patògen indicador i del medi de cultiu. La presència o absència de ferro no sembla ser un factor que potenciï l'antagonisme. En el cas dels fongs no s'observa però, influència del medi de cultiu emprat.

- 8- En el total de 72 soques s'ha observat un percentatge baix que manifestin antagonisme en tots els medis assajats vers 3 o 4 dels patògens (7). Solament 2 d'aquestes 7 soques han mostrat ser també efectives en bioassaigs d'inhibició de les infeccions causades per 2 dels 3 patògens assajats. Algunes de les soques efectives en els bioassaigs no són antagonistes *in vitro* en cap dels medis assajats enfront el mateix patogen.
- 9- S'han observat més soques promotores del creixement del portaempelts de prunera Marianna 2624 que no en l'híbrid de presseguer-ametller GF677 i les eficàcies assolides són també majors en el cas de Marianna 2624, detectant una elevada especificitat soca/portaempelts.
- 10- S'ha posat de manifest una gran diversitat genotípica entre les soques de *P. fluorescens*, tant a nivell de part de l'operó ribosomal (RFLP-rDNA) com del genoma (MRFLP-PFGE). L'anàlisi MRFLP-PFGE ha mostrat ser una tècnica amb un gran poder de discriminació a nivell de soca en el grup fluorescent de *Pseudomonas*.
- 11- Els patrons de macrorestricció genòmica (MRFLP-PFGE) amb el bacteri model *P. fluorescens* EPS288 són estables en el temps i independents de les condicions de cultiu assajades al laboratori o en mostres naturals, mostrant ser una tècnica eficaç en la identificació de reaïllats en mostres naturals inoculades prèviament amb el bacteri.
- 12- Les soques de *P. fluorescens* productores de floroglucinol formen un grup fenotípicament i genèticament heterogeni. S'ha establert una relació entre les agrupacions obtingudes en les anàlisis RFLP-rDNA, RFLP-*phlD* i l'anàlisi filogenètica de la seqüència del gen, que sembla relacionar-se amb els patrons de producció de diferents metabòlits (soques productores de Phl, Prn i HCN en una primera agrupació, de Phl i HCN en la segona i solament Phl en la tercera), però, en canvi no es relaciona amb l'origen geogràfic de les soques.
- 13- Les anàlisis estadístiques multivariants mitjançant les anàlisis de correspondències, correlacions bivariades i de freqüències de variables categòriques, han mostrat que els resultats obtinguts estan influenciats per la presència de clons repetits de la mateixa soca i emfatitzen la importància de disposar d'una tècnica per depurar la col·lecció de soques eliminant les que siguin genèticament idèntiques.
- 14- No s'ha observat una correlació significativa entre la inhibició de la infecció causada per *Stemphylium vesicarium*, *Penicillium expansum* i *Erwinia amylovora*, o la promoció del creixement en els portaempelts Marianna 2624 i GF677 i les característiques fenotípiques i genotípiques de les soques de *P. fluorescens*. Tanmateix, s'han obtingut correlacions en algun dels casos, però no se n'ha establert cap que sigui consistent en els tres tipus d'anàlisis estadístiques realitzades.
- 15- Possiblement, les diferències entre soques en la capacitat d'inhibició de les infeccions *in vivo* observades en el nostre treball, són fruit del resultat d'un conjunt de característiques que no hem estudiat. De fet, tal i com s'ha postulat des dels primers estudis sobre el biocontrol, l'èxit d'aquest és conseqüència de tot un conjunt de múltiples característiques de l'ACB.

Bibliografia

A

- Achouak, W.; Sutra, L.; Heulin, T.; Meyer, J.M.; Fromin, N.; Degraeve, S.; Christen, R. and Gardan, L. 2000b. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis*, *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol. 50: 9-18.
- Achouak, W.; Thiéry, J.M.; Roubaud, P. and Heulin, T. 2000a. Impact of crop management on intra-specific diversity of *Pseudomonas corrugata* in bulk soil. FEMS Microbiol. Ecol. 31: 11-19.
- Agius, F.; Sanguinetti, C. and Monza, J. 1997. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium loti* generated by PCR with arbitrary and repetitive sequences. FEMS Microbiol. Ecol. 24: 87-92.
- Alabouvette, C. and Lemanceau, P. 1999. Joint action of microbials for disease control. Pp. 117-136. A: Hall, F.R. and Menn, J.J. (eds). Methods in Biotechnology, vol. 5: Biopesticides: Use and Delivery. Humana Press. Totowa, N.J.
- Alabouvette, C.; Couteaudier, Y. and Louvet, J. 1985. Soils suppressive to Fusarium wilt: mechanisms and management of suppressiveness. A: Ecology and management of soil borne plant pathogens. Parer, C.A.; Rovira, A.D.; Moore, K.J.; Wong, P.T.W. and Kollmorgen, J.F. (eds). American Phytopathology Society. St. Paul, Mn. Pp. 101-106.
- Alemany, J. 2001. Caracterització dels metabòlits produïts per soques de *Pseudomonas fluorescens* efectives en el control biològic de fongs fitopatogènics. Tesi Doctoral. Universitat de Girona.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schiffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. and Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-Blast: A new generation of protein database search program. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.
- Andrews, J.H. 1985. Strategies for selecting antagonistic microorganism from the phylloplane. Pp.31-44. A: Windels, C.E. and Lindow, S.E. (eds.). Biological control on the phylloplane. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota.
- Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annu. Rev. Phytopathol. 30:603-635.
- Anzai, I.; Kudo, I. and Oyaizu, H. 1997. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 249-251.
- Arias, C.; Verdonck, L.; Swings, J.; Garay, E. and Aznar, R. 1997. Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2600-2606.
- Arima, K.; Imanaka, H.; Kousaka, M.; Fukuta, A. and Tamura, G. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. Agric. Biol. Chem. 28: 575-576.
- Avilla, J.; Sarasúa, M.J.; García, J.; Torá, R.; Vall, J.; and Roca, J.J. 1996. Control integrado de plagas y enfermedades en huertos de peral en Lleida. Fruticultura Profesional 78: 69-77.

B

- Bagnasco, P.; De la Fuente, L.; Gualtieri, G.; Noya, F. and Arias, A. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. Soil Biol. Biochem. 30: 1317-1322.
- Bakker, P.A.H.M.; Van Peer, R. and Schippers, B. 1991. Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent pseudomonads: mechanisms and prospects. Pp.217-230. A: Beemster, A.B.R.; Schippers, B. and Tempel, A. (eds.). Biotic interactions and soil-borne diseases. Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, and Tokyo.
- Bangera, M.G. and Thomashow, L.S. 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the poliketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:83-93.
- Bangera, M.G. and Thomashow, L.S. 1999. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polypeptide antibiotic 2,4 diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. J. Bacteriol. 181: 3155-3163.
- Barazani, O. and Friedman, J. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria?. J. Chem. Ecol. 10:2397-2406.
- Baril, C.; Richard, C.; Barauton, G. and Saint-Grous, I. 1989. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. Res. Microbiol. 140: 507-516.
- Barret, E.; Solanes, R.; Tang, J. and Palleroni, N.J. 1986. *Pseudomonas fluorescens* biovar V: its resolution into distinct component groups and the relationship of these groups to other *P. fluorescens* biovars, to *P. putida*, and to psychrotrophic pseudomonads associated with food spoilage. J. Gen. Microbiol. 132: 2709-2721.
- Barry, T.; Collieran, G.; Glennon, M.; Dunican, L.K. and Gannon, F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. PCR Methods Applic. Pp. 51-56.
- Barton, B.M.; Harding, G.P. and Zuccarelli, A.J. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. Anal. Biochem. 226: 235-240.
- Bashan, I. and Holguin, G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem. 30: 1225-1228.
- Bautsch, W.; Grothues, D. and Tümmler, B. 1988. Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by two-dimensional field inversion gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett. 52: 255-258.
- Bazzi, C.; Merighi, M.; Zhang, Y.; Jocks, S.; Geider, K. and López, M.M. 1999. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains isolated in Southern Europe by PFGE analysis. Acta Horticulturae 489: 197-200.
- Beattie, G.A. and Lindow, S.E. 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. Phytopathology 89: 353-359.
- Becker, J.O. and Cook, R. J. 1988. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent pseudomonads. Phytopathology 78: 778-782.

- Benizri, E.; Courtade, A.; Picard, C. and Guckert, A. 1998. Role of maize exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil. Biol. Biochem.* 30: 1481-1484.
- Bennasar, A.; Roselló-Mora, R.; Lalucat, J and Moore, E.R.B. 1996. 16S rRNA sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 200-205.
- Bereswill, S.; Bugert, I.; Bruchmuller, I. and Geider, K. 1995. Identification of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2636-2642.
- Bereswill, S.; Pahl, A.; Bellemann, P.; Berger, F.; Zeller, W. and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3522-3526.
- Berg, G.; Kurze, S.; Buchner, A.; Wellington, E.W. and Smalla, K. 2000. Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to *Verticillium* wilt. *Can. J. Microbiol.* 46: 1128-1137.
- Bergan, T. 1986. Human and animal-pathogenic members of the genus *Pseudomonas*. Pp. 666-700. A: Starr, M.P.; Stolp, H.; Trüper, H.G.; Ballows, A. and Schelegel, H.G. (eds.) *The prokaryotes. A handbook on habitats, Isolation, and identification of bacteria.* Springer-Verlag. New York.
- Berggren, I.; Alström, S. and Martensson, A.M. 2001. Deleterious properties of certain rhizosphere bacteria on field pea (*Pisum sativum*) under gnotobiotic and non-sterile conditions. *App- Soil Ecol.* 16: 169-177.
- Bert, F.; Branger, C.; Poutrel, B. and Lambert-Zechovsky, N. 1997. Differentiation of human and animal strains of *Streptococcus dysgalactiae* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 107-112.
- Berthier, F. and Ehrlich, S.D. 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.* 6: 97-106.
- Beyeler, M.; Keel, C.; Michaux, P. and Haas, D. 1999. Enhanced production of indole-3-acetic acid by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 affects root growth of cucumber, but does not improve protection of the plant against *Phytophthora* root rot. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 225-533.
- Bianciotto, V.; Andreotti, S.; Balestrini, R.; Bonafante, P. and Perotto, S. 2001. Mucoïd mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on micorrhizal and nonmicorrhizal carrot roots. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 2: 255-260.
- Blakeman, J.P. and Fokkema, N.J. 1982. Potential for biological control of the plant diseases on the phylloplane. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20: 167-192.
- Blears, M.J.; De Grandis, S.A.; Lee, H. and Trevors, J.K. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 99-114.
- Bloemberg, G.V.; O'Toole, G.A.; Lugtenberg, B.J.J. and Kolter, R. 1997. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4543-4551.
- Bloemberg, G.V.; Wijffjes, A.H.M.; Lamers, G.E.M.; Stuurman, N. and Lugtenberg, B.J.J. 2000. Simultaneous imaging *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 13: 1170-1176.
- Bloomfield, S. F.; Stewart G.S.A.B.; Dood, C.E.R.; Booth, I.R. and Power, E.G.M. 1998. The viable but non-culturable phenomenon explained?. *Microbiology* 144: 1-2.
- Blumer, C. and Haas, D. 2000a. Iron regulation of the *hcnABC* genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Microbiology* 146: 2417-2424.
- Blumer, C. and Haas, D. 2000b. Multicopy suppression of a *gacA* mutation by the *infC* operon in *Pseudomonas fluorescens* CHA0: competition with the global translational regulator RsmA. *FEMS Microbiol. Lett.* 187: 53-58.
- Bonaterra, A. 1995. Aïllament, caracterització i potencial antagonista de bacteris epífits pel control biològic de *Stemphylium vesicarium* en perera. Treball de recerca de programa de doctorat. Universitat de Girona.
- Bonaterra, A. 1997. Aïllament i caracterització de fitobacteris epífits antagonistes i control biològic de *Stemphylium vesicarium*. Tesi Doctoral. Universitat de Girona.
- Bonsall, R.F.; Weller, D. and Thomashow, L.S. 1997. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 951-955.
- Boronin, A.M. 1992. Diversity of *Pseudomonas* plasmids: to what extent?. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 461-468.
- Borowicz, J.J. and Omer, S. 2000. Influence of rhizobacterial culture media on plant growth and on inhibition of fungal pathogens. *BioControl* 45:355-371.
- Borowicz, J.J.; Hökeberg, M.; Van der Gaag, D.J.; Johanson, M. and Gerhardson, B. 1997. A PCR/RFLP analysis of 16S rDNA from *Pseudomonas* spp. suppressing fungal diseases in cereals. Fifth IOBC/EFPP Workshop. Molecular approaches in biological control. Abstract.
- Bouzar, H.; Jones, J.B.; Stall, R.E.; Louws, F.J.; Scheneider, M.; Rademaker, J.L.W.; de Bruijn, F.J. and Jackson, L.E. 1999. Multiphasic analysis of Xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the caribbean and central america: evidence for a common lineages within and between countries. *Phytopathology* 89: 328-335.
- Bowler, C. and Fluhr, R. 2000. The role of the calcium and activated oxigens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 241-246.
- Boyetchko, S.; Pedersen, E.; Punja, Z. and Reddy, M. 1999. Formulation of biopesticides. Pp. 487-508. A: Hall, F.R. and Menn, J.J.; (eds) *Methods in Biotechnology, vol. 5: Biopesticides: Use and Delivery.* Humana Press. Totowa. N.J.
- Brandl, M.T.; and Lindow S.E. 1998. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3256-3263.
- Bric, J.M.; Bostock, R.M. and Silverstone, S.E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilised on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 535-538.
- Brosch, R.; Lefèvre, M.; Grimont, F.; and Grimont, P.A.D. 1996. Taxonomic diversity of Pseudomonads revealed by computer interpretation of ribotyping data. *System. Appl. Microbiol.* 19: 541-555.
- Brosius, J.; Dull, T.J.; Sleeter, D.D. and Noller, H. F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 48: 107-127.
- Buchan, A.; Alber, M. and Hodson, R.E. 2001. Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16S-23S intergenic spacer region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 313-321.
- Budge, S.P. and Whipps, J.M. 2001. Potential for integrated control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced fungicide application. *Phytopathology* 91: 221-227.
- Budzikiewicz, H. 1993. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 209-228

- Burkhead, K.D.; Shisler, D.A. and Slininger, P.A. 1994. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* Bw37 in culture and in colonized wounds of potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2031-2039.
- Burr, T.J. and Katz, B. 1982. Evaluation of a selective medium for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* and *P. syringae* pv. *syringae* in apple orchards. *Phytopathology* 72: 564-567.
- Butt, T.M.; Harris, J.G. and Powell, K.A. 1999. Microbial biopesticides. Pp. 23-44. A: Hall, F.R. and Menn, J.J.; (eds). *Methods in Biotechnology*, vol. 5: *Biopesticides: Use and Delivery*. Humana Press. Totowa. N.J.

C

- Cabrefiga, J. 2000. Aplicació de tècniques moleculars per la prospecció selectiva, caracterització i millora de bacteris antagonistes pel control biològic d' *Erwinia amylovora* causant del foc bacterià de la pomera i perera. Treball de recerca del programa de doctorat de Biotecnologia. Universitat de Girona.
- Caesar, A.J. and Burr, T.J. 1987. Growth promotion of apple seedlings and rootsocks by specific strains of bacteria. *Phytopathology* 77: 1583-1588.
- Cain, C.C.; Henry, A.T.; Waldo III, R.H.; Casida Jr; L.J. and Falkinham, J.O. 2000. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad spectrum antimicrobial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4139-4141.
- Calvet, C.; Barea, J.M. and Pera, J. 1992. *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. *Soil Biol. Biochem.* 24: 775-780.
- Campbell, J.I.A.; Albrechtsen, M. and Sorensen, J. 1995a. Large *Pseudomonas* phages isolated from barley rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18: 63-74.
- Campbell, J.I.A.; Jacobsen, C.S. and Sorensen, J. 1995b. Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18: 51-62.
- Carle, G.F. and Olson, M.V. 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal field alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 12: 5647-5664.
- Carle, G.F.; Frank, M. and Olson, M.V. 1986. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 232: 65-68.
- Carrol, H.; Moëne-Loco, I.; Dowling, D. N. and O'Gara, F. 1995. Mutational disruption of the biosynthesis gene coding for the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol does not influence the ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* F113 in the rhizosphere of sugarbeets. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3002-3007.
- Carruthers, F. and Haas, D. 1997. Signal transduction and the two-component regulatory system encoded by the *LemA/GacA* genes in *Pseudomonas fluorescens* CHA0: implications for biological control. Fifth IOBC/EFPP Workshop. Molecular approaches in biological control. Abstract.
- Cartwright, D.K.; Chilton, W.S. and Benson, D.M. 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 211-216.
- Chalutz, E. and Drobny, S. 1998. Biological control of postharvest disease. Pp.157-169. A: Boland, G.J. and Kuykendall, L. D. (eds). *Plant-Microbe Interactions and biological control*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Champion, A.B.; Barret, E.L.; Palleroni, N.J.; Soderberg, K.L.; Kunisawa, R.; Contopoulou, R.; Wilson and Doudoroff, M. 1980. Evolution in *Pseudomonas fluorescens*. *J. General. Microbiol.* 120: 485-511.
- Chan, J.W.I.F. and Goodwin, P.H. 1999. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by PFGE and RFLP. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 867-878.
- Chancey, S.T.; Wood, D.W. and Pierson III, L.S. 1999. Two component transcriptional regulation of N-Acyl-Homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2294-2299.
- Chang, P.C. and Blackwood, A.C. 1968. Simultaneous production of three phenazine pigments by *Pseudomonas aeruginosa* Mac 436. *Can. J. Microbiol.* 15: 439-444.
- Chen, C.; Bélanger, R.R.; Benhamou, N. and Paulitz, T.C. 1999. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 477-486.
- Chen, W.; Grau, C.R.; Adey, E.A. and Meng, X. 2000. A molecular marker identifying subspecific populations of the soybean brown stem rot pathogen, *Phialophora gregata*. *Phytopathology* 90: 875-883.
- Cheng, H.P. and Lessie, T.G. 1994. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. *J. Bacteriol* 176: 4034-4042.
- Chernin, L.S. Ismailov, Z.; Haran, S. and Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.
- Chernin, L.S.; De La Fuente, L.; Sobolev, V.; Haran, S.; Vorgias, C.E.; Oppenheim, A.B. and Chet, I. 1997. Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.
- Chet, I.; Ordentlich, A.; Shapira, R. and Oppenheim, A. 1990. Mechanisms of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria. *Plant and Soil* 129: 85-92.
- Chin-A-Woeng, T.F.C.; Bloemberg, G.V.; Mulders, I.H.M.; Dekkers, L.C. and Lugtenberg, B.J.J. 2000. Root colonization by Phenazine-1-carboxamide producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 12: 1340-1345.
- Cho, J. And Tiedje, J.M. 2000. Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5448-5456.
- Cho, J.-C. and Tiedje, J.M. 2001. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3677-3682.
- Christensen, H.; Boye, M.; Poulsen, L.K. and Ramussen, O.F. 1994. Analysis of fluorescent *Pseudomonas* based on 23S ribosomal DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2196-2199.
- Chu, G.; Vollrath, D. and Davis, R.W. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234: 1582-1585.
- Chun, J.; Huq, A. and Colwell, R.R. 1999. Analysis of 16-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2202-2208.
- Cirvilleri, G.; Marino, R.; Catara, V. and Di-Silvestro-S. 1996. Monitoring of *Pseudomonas fluorescens* released in the phylloplane of different species in the microcosm. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 103(5): 507-516.

- Clerc, A.; Manceau, C. and Nesme, X. 1998. Comparison of random amplified polymorphic DNA with amplified length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1180-1187.
- Cole, S.T. and Saint Girons, I. 1994. Bacterial genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 14: 139-160.
- Colwell, R.R. 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* 104: 410-433.
- Compeau, J.; Jadoun, B.; Platsouka, E. and Levy, S. 1988. Survival of rifampicin-resistant mutants of *Pseudomonas putida* in soil systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2432-2438.
- Cook, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 53-80.
- Cook, R.J. and Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Pp 539. The American Phytopathology Society. APS. St Paul, Minnesota
- Cook, R.J.; Thomashow, L.S.; Weller, D.M.; Fujimoto, D.; Mazzola, M.; Bangera, G. and Kim, D. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 197-201.
- Corbell, N. and Loper, J.E. 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 177: 6230-6236.
- Costet, L.; Cordelier, S.; Dorey, S.; Baillieul, F.; Fritig, B. and Kauffmann, S. 1999. Relationship between Localized Acquired Resistance (LAR) and the Hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 8: 655-662.
- Cronin, D.; Moëgne-Loccoz, I.; Fenton, A.; Dunne, C.; Dowling, D.N. and O'Gara, F. 1997a. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol Pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1357-1361.
- Cronin, D.; Moëgne-Loccoz, I.; Fenton, A.; Dunne, C.; Dowling, D.N. and O'Gara, F. 1997b. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 95-106.
- Cugier, J. P. and Humbert, W. 1991. Stemphyliose du poirier. *Phytoma* 431: 47-50.
- Cullen, D. and Andrews, J.H. 1984. Epiphytic microbes as biological control agents. Pp. 381-399. A: T. Kosuge and Nester, E.W. (eds.). *Plant-Microbe interactions: Molecular and genetic perspectives*, vol. 1. Macmillan, Inc. New York, N.Y.
- Cullen, D.W. and Hirsch, P.R. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil. Biol. Biochem.* 30: 983-993.
- Cuppels, D.A. and Ainsworth, T. 1995. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronatine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3530-3536.
- Cusick, S.M. and O'Sullivan, D.J. 2000. Use of a single, Triplicate arbitrarily primed-PCR procedure for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2227-2231.

D

- Daffonchio, D.; Cherif, A. and Borin, S. 2000. Homoduplex and heteroduplex polymorphism of the amplified ribosomal 16S-23S Internal Transcribed Spacers describe genetic relationships in the "*Bacillus cereus* group". *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5460-5468.
- Dandurand, L.M.; Schotzko, D.J. and Knudsen, G.R. 1997. Spatial patterns of rhizoplane populations of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3211-3217.
- Davis, M.J.; Rott, P.; Warmuth, C.J.; Chatenet, M. and Baudin, P. 1997. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 87: 316-324.
- De Biasio, L.; Défago, G. and Duffy, B. 2000. Complementation with *gacS-gacA* restores biocontrol activity to a decrepit collection of fluorescent Pseudomonads. *Abstract. Phytopathology* 90: S19.
- de Boer, M.; van der Sluis, I.; van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. *Eur. J. Plant. Pathol.* 105: 201-210.
- de Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2180-2187.
- de Bruijn, F.J.; Rademaker, J. and Scheider, M. 1996. Biology of Plant-Microbe Interaction. Pp 497-502. A: G. Stacey, Mullin, B. and Gresshoff, P. (eds). *Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions*. The American Phytopathology Society. APS Press.
- De Ita, E.; Marsh-Moreno, R.; Guzmán, P. and Alvarez-Morales, A. 1998. Physical map of the chromosome of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Microbiology* 144: 493-501.
- De Meyer, D.; Audenaert, K. and Höfte, M. 1999a. *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on *in planta* salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 513-517.
- De Meyer, G.; Capieau, K.; Audenaert, K.; Buchala, A.; Métraux, J.P. and Höfte, M. 1999b. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the Systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 12:450-458.
- De Meyer, G.J.; Bigirimana, I.; Eland, I. and Hofte, M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 279-286.
- De Paradis, J. and Roth, D.A. 1990. Nucleic acid probes for identification of phyto-bacteria: Identification of genus specific 16S rRNA sequences. *Phytopathology* 80: 618-621.
- De Vos, D.; Lim, Jr. A.; De Vos, P.; Sarniguet, A.; Kersters, K. and Cornelis, P. 1993. Detection of the outer membrane lipoprotein I and its gene in fluorescent and non-fluorescent pseudomonads: implications for taxonomy and diagnosis. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2215-2223.
- De Waad, M.A.; Georgopoulos, S.G.; Hollomon, S.J.; Ishii, H.; Leroux, P.; Ragsdale, N.N. and Schiwnn, F.J. 1993. Chemical control of plant diseases: Problems and prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 403-421.
- Défago, G. and Haas, D. 1990. *Pseudomonas* as antagonists of soilborne plant pathogens: modes of action and genetic analysis. Pp. 249-291. A: Bollag, J.M. and Strzky G. (eds.) *Soil Biochemistry* Vol. 6. Marcel Dekker. New York.

- Dekkers, L.C.; Mulders, I.H.M.; Phoelich, C.C.; Chin-A-Woeng, T.F.C.; Wijfjes, A.H.M and Lugtenberg, B.J.J. 2000. The *sss* colonisation gene of tomato-*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicislycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonisation of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 11: 1177-1183.
- Delany, I.; Sheehan, M.M.; Fenton, A.; Bardin, S.; Aarons, S. and O'Gara, F. 2000. Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of *phlF* as a transcriptional repressor. *Microbiology* 146: 537-546.
- Demain, A.L. 1998. Induction of microbial secondary metabolism. *Int. Microbiol.* 1: 259-264.
- Den Dunnen, J.T. and Van Ommen, G.J.B. 1993. Methods for pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Bioch. and Biotec.* 38: 161-177.
- Denny, T.P.; Gilmour, M.N. and Selander, R.K. 1988. Genetic diversity and relationship of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1949-1960.
- Desai, M.; Tanna, A.; Efstratiou, A.; George, R.; Clewley, J. and Stanley, J. 1998. Extensive genetic diversity among clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* serotype M5. *Microbiology* 144: 629-637.
- Dieffenbach, C.V.; Lowe, T.M.J. and Dveksler, G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. Manual suplement. PCR Methods Applic.S 30-S36.
- Digat, B. and Gardan, L. 1987. Caractérisation, variabilité et selection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bulletin OEPP* 17: 559-568.
- Doignon-Bourcier, F.; Willems, A.; Coopman, R.; Laguerre, G; Gillis, M. and de Lajudie, P. 2000. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating samll senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplifies fragment lenght polymorphism fingerprint analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3987-3997.
- Dorca, M. 1998. Eficàcia d'aïllats epífits en el biocontrol de la podridura causada per *Penicillium expansum* en postcollita de fruits de llavor. Treball final de carrera d' Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentaries. Escola Politècnica de Girona. Universitat de Girona.
- Doudoroff, M. and Palleroni, N.J. 1974. *Pseudomonas* Migula 894. Pp: 217-243. A: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (eds.).
- Dowling, D.N. and O'Gara, F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *TIBECH.* 12: 133-141.
- Duffy, B. K.; Ownley, B.H. and Weller, D. M. 1997. Soil chemical and physical properties associated with suppression of Take-all of wheat by *Trichoderma koningii*. *Phytopathology* 87: 1118-1124.
- Duffy, B.; Keel, C.; Schnider-Keel, U. and Défago, G. 2000. Repression of bacterial genes by a pathogen phytotoxin determines the relative role of *Pseudomonas* antifungal compounds in biocontrol. *Abstract. Phytopathology* 90: S 20
- Duffy, B.K. and Défago, G. 1995. Influence of cultural conditions on spontaneous mutations in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (Abstr.). *Phytopathology* 85: 1146.
- Duffy, B.K. and Défago, G. 1997. Zinc improves biocontrol of fusarium crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology* 87: 1250-1257.
- Duffy, B.K. and Défago, G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2429-2438.
- Duffy, B.K. and Défago, G. 2000. Controlling inesability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3142-3150.
- Dunny, G.M. and Leonard, B.A.B. 1997. Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 527-564.
- Duppler, M. and Baker, R. 1984. Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent in soil. *Phytopathology* 74: 195-200.
- Durner, J.; Shah, J. and Klessig, D.F. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 266-274

E

- Edwards, S.G; McKay, T. and Seddon, B. 1994. Interaction of *Bacillus* species with phytopathogenic fungi: Methods of analysis and manipulation for biocontrol purposes. Pp. 101-116. A: Blakerman, J.P. and Williamson, B. (eds.). *Ecology of plant pathogens.* CAB International. U.K.
- Elad, Y.; Chet, I.; and Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Thichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol* 28: 719-725.
- Elasri, M.; Delorme, S.; Lemanceau, P.; Stewart, G.; Laue, B.; Glickmann, E.; Oger, P.M. and Dessaux, Y. 2001. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1198-1209.
- El-Banna, N. and Winkelmann, G. 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *J. Appl. Microbiol.* 85: 69-78.
- El-Ghaouth, A. 1997. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *J. Indus. Microbiol Biotec.* 19: 160-162.
- Ellis, R.; Timms-Wilson, T.M. and Bailey, M.J. 2000. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environ. Microbiol.* 2(3): 274-284.
- Emmert, E.A.B. and Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Let.* 171: 1-9.
- Eneback, S.A.; Wei, G. and Kloepper, J.W. 1998. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on Loblolly and Slash Pine seedling. *For-Sci.* 44: 139-144.
- Engbrecht, J.; Nealson, K. and Silverman, M. 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of funtions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32: 773-781.
- Epton, H.A.S.; Wilson, M.; Nicholson, S.L. and Sigeo, D.C. 1994. Biological Control of *Erwinia amylovora* with *Erwinia herbicola*. Pp. 335-352. A: Blakerman, J.P. and Williamson, B. (eds.). *Ecology of plant pathogens.* CAB International. U.K.
- Ercolani, G.L. 1991. Distribution of ephiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21: 35-48.

F

- Fakhouri, W. and Buchenauer, H. 1998. Establishment in tomato plants and mechanism of action of fluorescent pseudomonads antagonistic to the Fusarium wilt pathogen. Pp.6-64. IOBC Bulletin Vol. 21(9).
- Fedi, S.; Moëgne-Loccoz, I.; Dowling, D.N.; Smith, L.M. and O'Gara, F. 1997. Evidence for signaling between the phytopathogenic fungus *Phytophthora ultimum* and *Pseudomonas fluorescens* F113: *P. ultimum* represses the expression of genes in *P. fluorescens* F113, resulting in altered ecological fitness. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4261-4266.
- Fenton, A.M.; Sthephens, P.M.; Crowley, J.; O'Callaghan, M. and O'Gara, F. 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to *Pseudomonas* strain. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3873-3878.
- Folders, J.; Tommassen, J.; van Loon, L.C. and Bitter, W. 2000. Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 182: 1257-1263.
- Francés, J. 2000. Bases experimentales para la implementación de un control racional de podredumbres fúngicas y fisiopatías en posrecolección de pera en la zona de frutícola de Girona. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra.
- Francés, J.; Bonaterrea, A.; Juan, J.L. and Montesinos E. 1997. Influence of orchard management and postharvest treatments on fruit decay caused by *Penicillium expansum* and "core browning" in postharvest of pear. Acta Horticulturae 448: 203-209.
- Frändberg, E. and Schnürer, J. 1998. Antifungal activity of chitinolytic bacteria isolated from airtight stored cereal grain. Can. J. Microbiol. 44: 121-127.
- Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 26: 75-91
- Fravel, D.R. 2001. Comercial biocontrol products for use against soilborne crop diseases. A: <http://www.barc.usda.gov/psi/bpdl/bioprod.htm>
- Frey, P.; Frey-Klett, P.; Garbaye, J.; Berge, O. and Heulin, T. 1997. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas Fir- *Laccaria bicolor* micorrhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1852-1860.
- Frey, P.; Prior, P.; Marie, C.; Kotoujansky, A.; Trigalet-Demery, D. and Trigalet, A. 1994. Hrp⁻ mutants of *Pseudomonas solanacearum* as potential biocontrol agents of tomato bacterial wilt. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3175-3181.
- Frey, P.; Smith, J.J.; Albar, L.; Prior, P.; Saddler, G.; Trigalet-Demery, D. and Trigalet, A. 1996. Bacteriocin typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* race 1 of the French west Indies and correlation with genomic variation of the pathogen. Appl. Environ. Microbiol. 62: 473-479
- Froyd, J.D. 1997. Can synthetic pesticides be replaced with biologically-based alternatives?-an industry perspective. J. Indus. Microbiol. Biotec. 19: 192-195.
- Fujimoto, D.J.; Weller, D.M. and Thomashow, L.S. 1995. Role of secondary metabolites in root disease suppression. Chapter 24. Pp.330-347. A: Inderjit, Dakshini and Einhelling (eds.). Allelopathy: Organisms, processes and applications. ACS Symposium series. Washington, DC.
- Fukui, R.; Fukui, H. and Alvarez, A.M. 1999. Comparison of single versus multiple bacterial species on biological control of anthurium blight. Phytopathology 89: 366-373.
- Fukui, R.; Poinar, E.I.; Bauer, P.H.; Schroth, M.N.; Henson, M.; Wang, X.L. and Handcock, J.G. 1994. Spatial colonization patterns and interaction of bacteria on inoculated sugar beet seed. Phytopathology 84: 1338-1345.
- Fuqua, W.C.; Winans, S. and Greenberg, E. 1994. Quorum sensing in bacteria: the *luxR-luxI* family of cell density-responsive transcriptional regulators. J. Bacteriol. 269-275

G

- Gaffney, T.D.; Lam, S.T.; Ligon, J.; Gates, K.; Frazelle, A.; Di Maio, J.; Hill, S.; Goodwin, S.; Torkewitz, N.; Allshouse, A.M.; Kempf, H.J. and Becker, J.O. 1993. Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. Mol. Plant-Microbe Inter. 455-463
- Gamliel, A. and Katan, J. 1993. Suppression of major and minor pathogens by fluorescent Pseudomonads in solarized and nonsolarized soils. Phytopathology 83: 68-75.
- Garagulya, A.D.; Kiprianova, E.A. and Boiko, O.I. 1974. Antibiotic effect of bacteria from the genus *Pseudomonas* on phytopathogenic fungi. Mikrobiologicheskie Z. (Kiev) 36: 197-202.
- Garaizar, J.; López-Molina, N.; Laconcha, I.; Lau Baggesen, D.; Rementería, A.; Vavanco, A.; Audicana, A. and Perales, I. 2000. Suitability of PCR fingerprinting, Infrequent-restriction-site PCR, and Pulsed Field Gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5273-2581.
- Gardiner, K.; Laas, W.; and Patterson, D. 1986. Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis. Somatic Cell Mol. Gen. 12: 185-195.
- Gemmill, R.M. 1991. Pulsed-field gel electrophoresis. V.4 Pp. 1-45 A: A. Chrambach, M.J. Dunn and B. J. Rafola (eds). Adv. Electrophoresis. VCH Weinheim. Germany.
- Georgakopoulos, D.G.; Henson, M.; Panopoulos, N.J. and Schroth, M.N. 1994a. Analysis of expression of a phenazine biosynthesis locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 on seeds with a mutant carrying a phenazine biosynthesis locus-ice nucleation reporter gene fusion. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4573-4579.
- Georgakopoulos, D. G.; Henson, M.; Panopoulos, N. J. and Schroth, M. S. 1994b. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression *in vitro* with the ice nucleation reporter gene. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2931-2938.
- George, M.L.C.; Bustaman, M.; Cruz, W.T.; Leach, J.E. and Nelson, R.J. 1997. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Southeast Asia detected using PCR-based DNA fingerprinting. Phytopathology 87: 302-309.
- Geornaras, I.; Kunene, N.K.; Von Holy, A. and Hastings, J.W. 1999. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of *Pseudomonas* strains from a poultry processing plant. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3828-3833.
- Germida, J.J.; Diciliano, S.D. and Seib, A.M. 1998. Phenotypic plasticity of *Pseudomonas aureofaciens* (*lac ZY*) introduced

- into and recovered from field and laboratory microcosm soils. FEMS. Microbiol. Ecol. 27: 133-139.
- Ghisalberti, E.L. and Rowland, G.Y. 1993. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. J. Nat. Prod. 56: 1799-1804.
- Gill, S.; Belles-Isles, J.; Brown, G.; Gagné, S.; Lemieux, C.; Mercier, J.P. and Dion, P. 1994. Identification of variability of ribosomal DNA spacer from *Pseudomonas* soil isolates. Can. J. Microbiol. 40: 541-547.
- Ginard, M.; Lalucat, J.; Tümmeler, B. and Römling, U. 1997. Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:132-143.
- Giovannetti, L.; Venture, S.; Bazzicalupo, M.; Fani, M. and Materassi, R. 1990. DNA restriction fingerprint analysis of the soil bacterium *Azospirillum*. J. Gen. Microbiol. 136: 1161-1166.
- Girlanda, M.; Perotto, S.; Moenne-Loccoz, Y.; Bergero, R.; Lazzari, A.; Defago, G.; Bonfante, P. and Luppi, A.M. 2001. Impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and a genetically modified derivative on the diversity of culturable fungi in the cucumber rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1851-1864.
- Glandorf, D.C.M.; Werheggen, P.; Ansen, T.; Orritsma, J.-W.; Smith, E.; Lefflang, P.; Wernars, K.; Thomashow, L.S.; Laureijs, E.; Thomas-Oates, J.E.; Bakker, P. H.M. and Van Loon, L.C. 2001. Effect of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r on the fungal rhizosphere microflora of field-grown wheat. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3371-3378.
- Glanforf, D.C.M.; Brand, I.; Bakker, P.A.H.M. and Shippers, B. 1992. Stability of rifampicin resistance as a marker for root colonization studies of *Pseudomonas putida* in the field. Plant and Soil. 147: 135-142.
- Görlach, J.; Volrath, S.; Knauf-Beiter, G.; Hengy, G.; Beckhove, U.; Kogel, K.; Oostendorp, M.; Staub, T.; Ward, E.; Kessmann, H. and Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. The Plant Cell. 8: 629-643.
- Gorris, M.T.; Cambra, M.; Llop, P. and López, M.M. 1996. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. Acta Horticulturae 41: 41-45.
- Gould, W.D.; Hagedorn, C.; Bardinelli, T.R. and Zablutowicz, R.M. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. Appl. Environ. Microbiol. 49: 28-32.
- Graham, J.H.; Hartung, J.S.; Stall, R.E. and Chase, A.R. 1990. Pathological, restriction-length polymorphism, and fatty acid profile relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and non-citrus hosts. Phytopathology 80: 829-836.
- Greenberg, E.P. 1997. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. ASM News. Vol.63: 371-377.
- Grey, B.E. and Steck, T.R. 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3866-3872.
- Griffiths, R.P.; Moyer, C. L.; Caldwell, B.A.; Ye, C. and Morita, R.Y. 1990. Long term starvation-induced loss of antibiotic resistance in bacteria. Microb. Ecol. 19: 251-257.
- Grimont, P.A.D.; Vancanneyt, M.M Lefèvre, M.; Vandemeuñbroecke, K.; Vauterin, L.; Brosch, R.; Kersters, K. and Grimont, F. 1996. Ability of biologic and biotype-100 systems to reveal the taxonomic diversity of the Pseudomonads. System. Appl. Microbiol. 19: 510-527.
- Gross, D.C. 1991. Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 247-278.
- Grothues, D. and Rudolph, K. 1991. Macrorestriction analysis of plant pathogenic *Pseudomonas* species and pathovars. FEMS Microbiol. Lett. 79: 83-88.
- Grothues, D. and Tümmeler, B. 1987. Genome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed field inversion gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett. 48: 419-422.
- Grothues, D. and Tümmeler, B. 1991. New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species. Mol. Microbiol. 5(11): 2763-2776.
- Guetsky, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y. and Dinor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91: 621-627.
- Gullino, M.L. and Kuijpers, L.A.M. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 559-557.
- Gupta, V.; Willits, M. G. and Glazebrook, J. 2000. *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. Mol. Plant-Microbe Interac. 5:503-511.
- Gutierrez-Mañero, F.J.; Acero, N; Lucas, J.A. and Probanza, A. 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) growth. Plant Soil 182: 67-74.
- Gutterson, N. 1990. Microbial fungicides: recent approaches to elucidating mechanisms. Crit. Rev. in Biotechnol. 10(1): 69-91.

H

- Haas, D.; Keel, C.; Laville, J.; Maurhofer, M.; Oberhänsli, T.; Schinider, U.; Voisard, C.; Wüthrich, B. and Défago, G. 1991. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 involved in the suppression of root diseases. Vol. I, Pp. 450-456. A. Advances in Molecular Genetic of Plant- Microbe Interactions. Hennecke, H. and Verma, D.P.S. (eds).
- Hall, F.R. and Barry, J.W. 1995. An overview of bioremediation pest control agents. Pp.1-18 A: Biorational pest control agents. Hall, F.R.; Barry, J.W. (eds). American Chemical Society. Washington, DC.
- Hall, T.A. 1999. Bioedit 4.8.5: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98 NT. Nucleic. Acids. Simp- ser 41: 95-98.
- Hamdan, H.; Weller, D. and Thomashow, L.S.1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M480-R. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3270-3277.
- Hammer, P.E.; Burd, W.; Hill, D.S.; Ligon, J.M and van Pée, K. 1999. Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. FEMS Microbiol. Letters. 180: 34-44.
- Hammer, P.E.; Hill, D.S.; Lam, S.T.; Van Pée, K. and Ligon, J.M. 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2147-2154.
- Hammerschmidt, R. and Smith-Becker, J.A. 1999. The role of salicylic acid in disease resistance. Pp. 37-53. A: Induced plant defenses against pathogens and herbivores. Agrawal, A.A.; Tuzun, S. And Bent, E. (eds). The American Phytopathology Society. APS Press, St. Paul, Minnesota.

- Han, D.Y.; Coplin, D.L.; Bauer, W.D. and Hoitink, H.A.J. 2000. A rapid bioassay for screening rhizosphere microorganism for their ability to induce Systemic Resistance. *Phytopathology* 90:327-332.
- Handelsman, J. and Stabb, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plants pathogens. *The Plant Cell*. 8: 1855-1859.
- Handelsman, J.; Raffel, S.; Mester, E.H.; Wunderlich, L. and Grau, C.R. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedling with *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 713-718.
- Hannusch, D.J. and Boland, G.J. 1996. Influence of air temperature and relative humidity on biological control of white mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Phytopathology* 86: 156-162.
- Hansen, M.; Kragelund, L.; Nybroe, O. and Sorensen, J. 1997. Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 353-360.
- Haran, S.; Schickler, H. and Chet, I. 1996. Molecular mechanism of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 142: 2321-2331.
- Harman G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84: 377-393.
- Harrison, L.A.; Letendre, L.; Kovacevich, P.; Pierson, E. and Weller, D. 1993. Purification of an antibiotic effective against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* produced by a biocontrol agent *Pseudomonas aureofaciens*. *Soil Biol. Biochem.* 25: 115-221.
- Harrison, S.P.; Jones, D.G. and Young, J.P.W. 1989. *Rhizobium* populations genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1061-1069.
- Hartmann, R.k.; Toschka, H.Y.; Ulbricht, N. and Erdmann, V.A. 1986. Genomic organization of rDNA in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 195: 187-193.
- Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopatol.* 29: 65-87.
- Heinaru, E.; Truu, J.; Stottmeister, U. and Heinaru, A. 2000. Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 195-205.
- Hermosa, M.R.; Grondona, I.; Iturriaga, E.A.; Diaz-Minguez, J.M.; Castro, C.; Monte, E. and Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterisation and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1890-1898.
- Herrera, A. and Chet, I. 1998. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. Pp. 263-282. A: Altman (ed.). *Agricultural biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Heydorn, A.; Nielsen, A.T.; Hentzer, M.; Sternberg, C.; Givskov, M.; Esboll, B.J. and Molin, S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146: 2395-2407.
- Hildebrand, D.C, Scroth, M.N. and Sands, D.C. 1988. *Pseudomonas*. A: Laboratori guide for identification of Plant pathogenic bacteria. A: Schaad, N.W. (ed). APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota.
- Hirano, S.S. and Upper, C.D. 1994. Autoecology of foliar pseudomonads. Pp. 227-243. A: Blakerman, J.P. and Williamson, B. (eds). *Ecology of plant pathogens*. CAB International. U.K.
- Hirano, S.S. and Upper, C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Mol. Microbiol. Rev.* 64: 624-653.
- Hoffland, E.; Halukin, J. and van Pelt, J.A. 1996. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and non pathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology* 86: 757-762.
- Holloway, B. W. 1996. *Pseudomonas*. Genetics and taxonomy. Pp. 22-32. A: *Molecular biology of Pseudomonas*. Nakazawa, T. Furukawa, K.; Haas, D. and Silver, S. (eds). ASM Press. American Society for Microbiology Washington, DC
- Holloway, B.W. and Morgan, A.F. 1986. Genome organization in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 79-105.
- Holloway, B.W.; Escuadra, M.D.; Morgan, A.F.; Safferu, R. and Krishnapillai, V. 1992. The new approaches to whole genome analysis of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 101-106.
- Howard, P.J. Harsono, K.H. and Luchansky, J.B. 1992. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri* by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 709-712.
- Howie, W.J. and Suslow, T.V. 1991. Role of the antibiotic biosynthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 393-399.
- Hrabak, E.M.; and Willis, D.J. 1992. The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two component regulators. *J. Bacteriol.* 174: 3011-3020.
- Hugh, R. And Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentation versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 66: 24-26.

I

- Inbar, J.; Abramshy, D.; Cohen, D. and Chet, I. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedling grown under commercial conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 100: 337-346.
- Iteman, I.; Rippka, R.; Tandeau de Marsac, N. and Herdman, M. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* 146: 1275-1286.

J

- Jackson, M.A. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *J. Indus. Microbiol Biotec.* 19: 180-187.
- James, D.W. and Gutterson, N.I. 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1183-1189.
- Janisiewicz, W.J. 1998. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits. Challenges and opportunities. Pp 171-198. A: Boland, G.J. and Kuykendall, L. D. (eds). *Plant-Microbe Interactions and biological control*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Janisiewicz, W.J.; Tworowski, T.J. and Sharer, C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest

- diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology* 90: 1196-1200.
- Janse, J.D.; Derks, J.H.J.; Spit, B.E. and Van Der Tuin, W.R. 1992. Classification of fluorescent soft rot *Pseudomonas* bacteria including *P. marginalis* strains, using whole cell fatty acid analysis. *System. Appl. Microbiol.* 15: 538-553.
- Janssen, P.; Coopman, R.; Huys, G.; Swings, J.; Bleeker, M.; Bvos, P.; Zabeau, M. and Kersters, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142: 1881-1893.
- Jaunet, T.; Laguerre, G.; Lemanceau, P.; Frutos, R. and Notteghem, J.L. 1995. Diversity of *Pseudomonas fuscovaginae* and other pseudomonads isolated from diseased rice. *Phytopathology* 85: 1534-1541.
- Jaunet, T.X. and Wang, J. 1999. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* 89: 320-327.
- Jensen, M.A.; Webster, J.A. and Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reactions-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:945-952.
- Johnson, J.L. and Palleroni, N.J. 1989. Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 230-235.
- Jones, A.L. and Schnabel, E.L. 2000. The development of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora*. Pp.235-252. A: Fire Blight. The disease and its causant agent, *Erwinia amylovora*. Vaneste J.L. (ed). CABI Publishing . UK.
- Juan, J.J. 1999. Bases per a la millora de la qualitat de la poma Golden en postcolliita en sistemes de producció integrada de fruita. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida.

K

- Kaku, S. 1966. Change in supercooling in growing leaves of some evergreen plants. *Bot. Mag.* 77: 283-289.
- Keel, C.; Shinder, U.; Maurhofer, M.; Voisard, M.; Laville, J.; Burger, U.; Wirthner, P.; Haas, D. and Défago, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 4-13.
- Keel, C.; Voisard, C.; Berling, C.H.; Kahr, G. and Défago, G. 1989. Iron sufficiency, a prerequisite for the suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0. *Phytopathology* 79: 584-589.
- Keel, C.; Weller, D.M.; Natsch, A.; Défago, G.; Cook, R.J. and Thomashow, L.S. 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 552-563
- Kelly, A.; Alcalá-Jiménez, R.; Bainbrigde, B.W.; Heale, J.B.; Pérez-Artés, E. and Jiménez-Díaz, R.M. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* 84: 1293-1298.
- Kelly, W.J.; Huang, C.M. and Asmundson, R.V. 1993. Comparison of *Leuconostoc oenos* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3969-3972.
- Kersters, K.; Ludwig, W.; Vancanneyt, M.; De Vos, P.; Gillis, M. and Scheifer, K. 1996. Recent changes in the classification of the Pseudomonads: an overview. *System. Appl. Microbiol.* 19: 465-477.
- Kessmann, H.; Staub, T.; Ligon, J.; Oostendorp, M. and Ryals, J. 1994. Activation of systemic acquired resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 100: 359-369.
- Khattak, M.N. and Matthews, R.C. 1993. Genetic relatedness of *Bordetella* species as determined by macrorestriction digest resolved by pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 659-664.
- Khbaya, B.; Neyra, M.; Normand, P.; Zerhari, K. and Filali-Maltouf. 1998. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4912-4917.
- Kiewitz, C. and Burkhardt, T. 2000. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J. Bacteriol.* 182: 3125-3135.
- Kiewitz, C.; Larbig, K.; Klockgether, J.; Weinel, C. and Tümmler, B. 2000. Monitoring genome evolution *in vivo*: reversible chromosomal integration of a 106 kb plasmid at two tRNA^{Lys} gene loci in sequential *Pseudomonas aeruginosa* airway isolates. *Microbiology* 146: 2365-2373.
- Kim, D.S.; Cook, R.J. and Weller, D.M. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87: 551-558.
- King, E.O.; Ward, M.K. and Rainay, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of the pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kinkel, L.L.; Wilson, M. and Lindow, S.E. 2000. Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. *Microb. Ecol.* 39: 1-11.
- Kirner, S.; Hammer, P.E.; Hill, D.S.; Altmann, A.; Fisher, I.; Weislo, L.J.; Lanahan, M.; Van Pée, K. and Ligon, J.M. 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas aureofaciens*. *J. Bacteriol.* 180: 1939-1943.
- Klement, Z. 1963. Rapid detection of the pathogenicity of the phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199: 299-300.
- Klingler, J.M.; Stowe, R.P.; Obenhuber, D.C.; Groves, T.O.; Mishra, S.K. and Pierson, D.L. 1992. Evaluation of the biolog automated microbial identification system. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2089-2092.
- Kloepper, J.W. 1992. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Pp. 255-274. A: Metting F.B. (ed.). *Soil Microbial Ecology*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kloepper, J.W.; Leong, J.; Teintze, M. and Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886.
- Knight, S.C.; Anthony, V.M.; Brady, A.M.; Greenland, A.J.; Heaney, S.P.; Murray, D.C.; Powell, K.A.; Schulz, M.A.; Spinks C.A.; Worthinhton, P.A. and Youle, D. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 349-372.
- Köhl J. and Fokkema, N.J. 1998. Strategies for Biocontrol of necrotrophic fungal foliar pathogens. Challenges and opportunities. Pp 49-88. A: Boland, G.J. and Kuykendall, L. D. (eds). *Plant-Microbe Interactions and biological control*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kolter, R.; Siegele, D.A. and Tormo, A. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 855-874.
- Kovaks, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178: 703.

- Kragelund, L.; Leopold, K. and Nybroe, O. 1996. Outer membrane protein heterogeneity within *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* and use of an OprF antibody as a probe for rRNA homology Group I pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 480-485.
- Kraus, J. and Loper, J.E. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Phytopathology* 82: 264-271.
- Kraus, J. and Loper, J.E. 1995. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 849-854.
- Kumar, D. and Klessig, D.F. 2000. Differential induction of tobacco MAP kinases by the defence signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene and jasmonic acid. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 13: 347-351.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jacobsen, and Nei M. 2001. MEGA 2.0. Molecular Evolutionary Genetics analysis software). *Bioinformatics* (submitted).
- L**
- Laguerre, G.; Berkum, P.; Amarger, N. and Prévost, D. 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legum species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4748-4758.
- Laguerre, G.; Mavingui, P.; Allard, M.R.; Charnay, M.P.; Louvrier, P.; Mazurier, S.I.; Rigottier-Gois, L. and Amarger, N. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2029-2036.
- Laguerre, G.; Rigottier-Gois, L. and Lemanceau, P. 1994. Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/restriction fragment analysis of 16S rDNA. *Mol. Ecol.* 3: 479-487.
- Landa del Castillo, B. 1999. Control biológico de la fusariosis vascular del garbanzo mediante antagonistas microbianos. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Landa, B.B.; Navas-Cortés, A.; Hervás, A. and Jiménez-Díaz, R.M. 2001. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on suppression of fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology* 91: 807-816.
- Latour, X.; Corberand, T.; Laguerre, G.; Allard, F. and Lemanceau, P. 1996. The composition of fluorescent pseudomonad population associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2449-2456.
- Latour, X.; Philippot, L.; Corberand, T. and Lemanceau, P. 1999. The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 163-170.
- Laue, B.E.; Jiang, Y.; Chhabra, S.R.; Jacob, S.; Stewart, G.S.A.B.; Hardman, A.; Downie, J.A.; O'Gara, F. and Williams, P. 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenyl) homoserine lactone, via Hdts, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146: 2469-2480.
- Laville, J.; Blumer, C.; Von Schroetter, C.; Caia, V.; Défago, G.; Keel, C. and Haas, D. 1998. Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* 180: 3187-3196.
- Laville, J.; Voisard, C.; Keel, C.; Maurhofer, M.; Défago, G. and Hass, D. 1992. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1562-1566.
- Leach, J.E.; Rhoads, M.L.; Vera Cruz, C.M.; White, F.F.; Mew, T.W. and Leung, H. 1992. Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2188-2195.
- Leach, J.E.; White, F.F.; Rhoads, M.L. and Leung, H. 1990. A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovars of *X. campestris*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 3: 238-246.
- Leben, C. 1964. Influence of bacterial isolates from healthy cucumber leaves on two leaf diseases of cucumber. *Phytopathology* 54: 405-408.
- Lee, S. and Cooksey, D.A. 2000. Genes expressed in *Pseudomonas putida* during colonization of a plant-pathogenic fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2764-2772.
- Leeman, M.; den Ouden, F.M.; van Pelt, J.A.; Dirkx, F.P.M.; Steijl, H.; Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 86: 149-155.
- Leibinger, W.; Breuker, B.; Hahn, M. and Mendgen, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87: 1103-1110.
- Leisinger, T. and Margraff, R. 1979. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* 43: 422-442.
- Lelliott, R. and Stead, D.E. 1987. Pp. 216. A: Methods in plant pathology. Vol 2. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Lemanceau, P.; Coeberand, T.; Gardan, L.; Latour, X.; Laguerre, G.; Boeufgras, J. and Alabouvette, C. 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1004-1012.
- Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopatol.* 24: 187-209.
- Levy, E.; and Carmeli, S. 1995. Biological control of plant pathogens by antibiotic-producing bacteria. Pp. 300-309. A: Allelopathy: organisms, processes and applications. Waller, G.R (ed) American Chemical Society: Washington, DC.
- Liao, X.; Xarlebois, I.; Ouellet, C.; Monency, M.J.; Deward, K.; Lightfoot, J.; Foster, J.; Siehnel, R.; Schweizer, H.; Lam, J.S.; Hancock, R.E.W. and Levesque, R.C. 1996. Physical mapping of 32 genetic markers on the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 chromosome. *Microbiology.* 142: 79-86.
- Lilley, A.K. and Bailey, M.J. 1997a. The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked pseudomonad population colonizing the sugar beet phytosphere is related to local environmental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1577-1583.
- Lilley, A.K. and Bailey, M.J. 1997b. Impact of plasmid pQBR103 acquisition and carriage on the phytosphere fitness of *Pseudomonas fluorescens* SBW25: burden and benefit. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1584-1587.

- Lilley, A.K.; Fry, J.C.; Day, M.J. and Bailey, M.J. 1994. *In situ* transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp. in sugar beet rhizosphere. *Microbiology* 140: 27-33.
- Lim, H.; Kim, Y. and Kim, S. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 510-516.
- Lima, G.; Arru, S.; De Curtis, F. and Arras, G. 1999. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:223-229.
- Limon, M.C.; Pintor-Toro, J.A. and Banítez, T. 1999. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* 89: 254-261.
- Lin, W. and Johnson, E.A. 1995. Genome analysis of *Clostridium botulinum* type A by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4441-4447.
- Lin, Y.; Kieser, H.M.; Hopwood, D.A. and Chen, C.W. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* 10: 421-427.
- Lindow, S.E.; Desurmont, C.; Elkins, R.; McGourty, G.; Clark, E. and Brandl, M.T. 1998. Occurrence of indole-3-acetic acid-producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet. *Phytopathology* 88: 1149-1157.
- Lindow, S.E. 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 21: 363-384.
- Lindow, S.E. 1987. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by ice⁻ *Pseudomonas syringae* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2520-2527.
- Lindow, S.E.; Arny, D.C. and Upper, C.D. 1983. Biological control of frost injury: an isolate of *Erwinia herbicola* antagonistic to ice nucleation active bacteria. *Phytopathology* 73: 1097-1102.
- Linton, D.; Dewhurst, F.E.; Clewley, J.P.; Owen, R.J.; Burnens, A.P. and Stanley, J. 1994. Two types of 16S rRNA genes are found in *Campylobacter helveticus*: analysis, applications and characterization of the intervening sequence found in some strains. *Microbiol.* 140: 847-855.
- Llop, P.; Bonaterra, A.; Peñalver, J. and López, M.M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2071-207
- Llop, P.; Caruso, P.; Cubero, J.; Morente, C. And López, M.M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods* 37: 23-31.
- Llorente, I. 1997. Desenvolupament d'un sistema de previsió de risc d'infecció per *Stemphylium vesicarium*. Avaluació, validació i implementació en parcel·les experimentals en camps comercials de perera. Tesis Doctoral. Universitat de Girona.
- Llorente, I.; Vilardell, P.; Bugiani, R.; Gherardi, I. and Montesinos, E. 2000. Evaluation of BSPcast disease warning system in reduced fungicide use programs for management of brown spot of pear. *Plant Dis.* 84: 631-637.
- Loper, J. and Henkels, M.D. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5357-5363.
- Loper, J.E. and Buyer, J.S. 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 5-13.
- Loper, J.E.; Henkels, M.D.; Roberts R.G.; Grove, G.G.; Willet, M.J. and Smith, T.J. 1991. Evaluation of streptomycin, oxytetracycline, and copper resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pear ochars in Washington state. *Plant Dis.* 75: 287-290.
- López, M. M.; Montesinos, E.; Lecompte, P. and Paulin, J.P. 1996. El fuego bacteriano del peral, una amenaza permanente: situación actual, epidemiología y control de la enfermedad. *Fruticultura Profesional* 78: 79-87.
- López, M.M.; Gorris, M.T.; Llop, P.; Cambra, M.; Roselló, M.; Borruel, M.; Plaza, B.; Garcia, P.; Palomo, J.L. and Barra, D. 1999. Fire blight in Spain: situation and monitoring. *Acta Horticulturae* 489: 187-191.
- Lorito, M.; Di Pietro, A.; Hayes, C.K.; Woo, S.L. and Harman, G.E. 1993. Antifungal synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* 83: 721-728.
- Lottmann, J.; Heuer, H.; de Vries, J.; Mahn, A.; Düring, K.; Wackernagel, W.; Smalla, K. and Berg, G. 2000. Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 41-49.
- Louvet, J.; Rouxel, F. and Alabouvette, C. 1976. Recherches sur la résistance des sols aux maladies I-Mise en évidence de la nature microbiologique de la résistance des sol au développement de la fusariose vasculaire du melon. *Ann. Phytopatol.* 8: 425-436.
- Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. and de Bruijn, F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2286-2295.
- Louws, F.J.; Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J. 1999. The three Ds of PCR-Based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 37: 81-125
- Lübeck, P.S.; Hansen, M. and Sorensen, J. 2000. Simultaneous detection of the establishment of seed-inoculated *Pseudomonas fluorescens* strain DR54 and native soil bacteria on sugar beet root surfaces using fluorescence antibody and *in situ* hybridization techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32: 11-19

M

- Madi, L.; Katan, T.; Katan, J. and Henis, I. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces favus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology* 87: 1054-1060.
- Maes, M. 1993. Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. *FEMS Microbiol. Lett.* 113: 161-166.
- Maes, M.; Garbeva, P. and Crepel, C. 1996. Identification and sensitive detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathol.* 45: 1139-1149.
- Mahenthalingam, E.; Campbell, M.E.; Foster, J.; Lam, J.S. and Speert, D.P. 1996. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1129-1135.
- Manceau, C. and Horvais, A. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 498-505.

- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Manocha, M.S. and Govindsamy, V. 1998. Chitinolytic enzymes of fungi and their involvement in biocontrol of plant pathogens. Pp. 309-327. A: Boland, G.J. and Kuykendall, L.D. (eds) Plant-microbe interactions and biological control. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Martín, A.; Palacios, G.; Olmo, A.; Martín-Gonzalez, A.; Ruiz-Perez, L. M. and Gutierrez, J. C. 1997. Karyotypic variability in ribosomal DNA subchromosome size among colpoid ciliates, a possible tool to differentiate colpoid species. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1602-1605.
- Masai, E.; Sugiyama, K.; Iwashita, N.; Shimizu, S.; Hauschild, J.E.; Hatta, T.; Kimbara, K.; Yano, K. and Fukuda, M. 1997. The *bphDEF-meta*-cleavage pathway genes involved in biphenyl/plorichorinated biphenyl degradation are located on a linear plasmid and separated from the initial *bphACB* genes in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. Gene 187: 141-149.
- Mascher, F.; Hase, C.; Moëne-Loccoz, Y. and Défago, G. 2000. The viable but no culturable state induced by abiotic stresses in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1662-1667.
- Mathre, D.E.; Cook, R.J. and Callan, N.W. 1999. From discovery to use. Traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant diseases control. Plant Dis. 83: 972-983.
- Maule, J. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis. Pp. 81-104. A: The nucleic acid protocols handbook. R. Rapley (ed). Humana Press Inc.; Totowwa NJ.
- Maurhofer, M.; Hase, C.; Meuwly, P.; Metraux, J. P. and Défago, G. 1994. Induction systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene for pyoverdine production. Phytopathology. 84: 139-146.
- Maurhofer, M.; Reimann, C.; Schmidli-Sacherer, P.; Heeb, S.; Haas, D. and Défago, G. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance on tobacco against tobacco necrosis virus. Phytopathology 88: 678-684.
- Mavrodi, D.V.; Ksenzenko, V.N.; Bonsall, R.F.; Cook, J.; Boronin, A.M. and Thomashow, L.S. 1998. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. J. Bacteriol. 180: 2541-2548.
- Mavrodi, O.V.; McSpadden Gardener, B.B.; Mavrodi, D.V.; Bonsall, R.F.; Weller, D.M. and Thomashow, L.S. 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology 91: 35-43.
- Mazzola, M. and Gu Y. 2000. Impact of wheat cultivation on microbial communities from replant soils and apple growth in greenhouse trials. Phytopathology 90: 114-119.
- Mazzola, M.; Cook, R.J.; Tomashow, L.S.; Weller, D.M. and Pierson III, L.S. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2616-2624.
- Mazzola, M.; Fujimoto, K.; Thomashow, L. and Cook, J. 1995. Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of Take-All of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2554-2559.
- McClelland, M.; Jones, R.; Patel, I. and Nelson, M. 1987. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomics. Nuc. Acid Res. 15: 5985-6005.
- McCormack, P.J.; Wildman, H.G. and Jefries, P. 1994. Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeast and yeastlike fungi. Appl. Environ. Microbiol. 60: 927-931.
- McGuire, R.G. 2000. Population dynamics of postharvest decay antagonists growing epiphytically and within wounds on grapefruit. Phytopathology 90: 1217-1223.
- McManus, P.S. and Jones, A.L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot reverse hybridizations. Phytopathology 85: 618-623.
- McSpadden Gardener, B.B.; Mavrodi, D.V.; Thomashow, L.S. and Weller, D.M. 2001. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. Phytopathology 91: 44-54.
- McSpadden Gardener, B.B.; Shroeder, K.L.; Kalloger, S.R.; Raaijmakers, J.M.; Thomashow, L. and Weller, D.M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1939-1946.
- Meunier, J.R. and Grimont, P.A.D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Res. Microbiol. 144: 373-379.
- Meyer, J.M.; Azelvandre, P. and Georges, C. 1992. Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Biofactors 4: 23-37.
- Microbial Genomes Blast Databases. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Mirleau, P.; Delorme, S.; Philippot, L.; Meyer, J.M.; Mazurier, S. and Lemanceau, P. 2000. Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. FEMS Microbiol. Ecol. 34: 35-44.
- Moëne-Loccoz, I.; McHugh, B.; Stephens, P.M.; McConnell, F.I.; Gennon, J.D.; Dowling, D.N. and O'Gara, F. 1996. Rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* sp. B24 genetically modified to utilize additional ferric siderophores. FEMS Microbiol. Ecol. 19: 215-225.
- Moëne-Loccoz, Y.; Naughton, M.; Higgins, P.; Powell, J.; O'Connor, B. and O'Gara, F. 1999. Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. J. Appl. Microbiol. 86: 108-116.
- Moëne-Loccoz, Y.; Tichy, H-V.; O'Donnell, A.; Simon, R. and O'Gara, F. 2001. Impact of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 on intraspecific diversity of resident culturable fluorescent Pseudomonads associated with the roots of field-grown sugar beet seedlings. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3418-3425.
- Molina, L.; Ramos, C.; Duque, E.; Ronchel, M.C.; García, J.M.; Wyke, L. and Ramos, J.L. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT24440 in soil and in the rhizosphere of plant under greenhouse and environmental conditions. Soil. Biol. Biotech. 32: 315-321.

- Monte, E.; Grondona, I.; González, F.J.; Llobel, A. and Garcia, I. 2000. Control biológico: de las esporas a los genes. *Phytoma*, 120: 32-37.
- Montesinos, E. and Bonaterra, A. 1996. Dose-response models in biological control of plant pathogens. An empirical verification. *Phytopatology* 86: 464-472.
- Montesinos, E. and Llorente, I. 1999. Evolución del fuego bacteriano y estudio preliminar de las zonas de riesgo climático en el noreste español. *Fruticultura Profesional* 103: 5-22.
- Montesinos, E. and Vilardell, P. 1988. El desecamiento bacteriano del peral producido por *Pseudomonas syringae*. *Fruticultura Profesional* 18: 56-59
- Montesinos, E. and Vilardell, P. 1991. Nuevos avances en el control de necrosis de yemas de flor en peral. *Fruticultura Profesional*. 40: 14-20.
- Montesinos, E. and Vilardell, P. 1996. La necrosis de yemas de flor en peral. Una enfermedad compleja y de difícil control. *Fruticultura Profesional* 78: 88-104.
- Montesinos, E.; Bonaterra, A.; Ophir, Y. and Beer, S.V. 1996a. Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. *Phytopathology* 86: 856-863.
- Montesinos, E.; Llorente, I.; Moragrega, C.; Bonaterra, A.; Cervantes, J. and Vilardell, P. 1996b. Desarrollo y evaluación a escala productiva de un sistema de control racional de la estemfiliosis (*Stemphylium vesicarium*) del peral. *Fruticultura Profesional* 78: 96-104.
- Montesinos, E.; Melgarejo, P.; Cambra, M.A. and Pinochet, J. 2000. Las enfermedades de los frutales de hueso y pepita y su importancia económica en España. Pp. 15-17. A: Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso. Montesinos, E.; Melgarejo, P.; Cambra, M.A. and Pinochet (eds). Ediciones Mundi-Prensa Barcelona.
- Montesinos, E.; Moragrega, C.; Llorente, I.; Vilardell, P.; Bonaterra, A.; Ponti, I.; Bugiani, R.; Cavanni, P. and Brunelli, A. 1995. Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. *Phytopathology* 85: 586-592.
- Montejo, O. 1999. Estudi de la producció de l'antibiòtic 2,4-diacetilfloroglucinol per soques de *Pseudomonas fluorescens* de diferents orígens. Treball final de carrera d' Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries. Escola Politècnica de Girona. Universitat de Girona.
- Moore, E.R.B.; Mau, M.; Arnscheidt, A.; Böttger, E.C.; Hutson, R.A.; Collins, M.D.; Van de Peer, I.; De Wachter, R. and Timmis, K. N. 1996. The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural intrageneric relationships. *System. Appl. Microbiol.* 19: 478-492.
- Moragrega, C. 1997. Interacció *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*-perera. Factors determinants i activitat de diversos fosfonats en el desenvolupament de la malaltia. Tesi Doctoral. Universitat de Girona.
- Morais, P.V.; Mesquita, C.; Andrade, J.L. and Da-Costa, M.S. 1997. Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water bottling plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 851-856.
- Moreira, D. and Philippe, H. 2000. Molecular phylogeny: pitfalls and progress. *Internat. Microbiol.* 3: 9-16.
- Morgen, B.D.; Olson, H.R.; Sparks, R.B.; Gudmestad, N.C. and Oleson, A.E. 1990. Genetic variation in strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum*: polymorphisms in restriction fragments containing a highly repeated sequence. *Phytopathology* 80: 90-96.
- Mylvaganam, S. and Dennis, P. 1992. Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Genetics*. 130: 399-410.

N

- Nagpal, M.; Fox, K.F. and Fopx, A. 1998. Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome between strains for closely related organisms. *J. Microbiol. Methods*. 33: 211-219.
- Naseby, D.C.; Pascual, J.A. and Lynch, J.M. 1999. Carbon fractions in the rhizosphere of pea inoculated with 2,4 diacetylfloroglucinol producing and non-producing *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Appl. Microbiol.* 87: 173-181.
- Natsch, A.; Keel, C.; Hebecker, N.; Laasik, E. and Défago, G. 1997. Influence of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and its antibiotic overproducing derivative on the diversity of resident root colonizing pseudomonads. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 341-352.
- Natsch, A.; Keel, C.; Hebecker, N.; Laasik, E. and Défago, G. 1998. Impact of *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and a derivative with improved biocontrol activity on the culturable resident bacterial community on cucumber roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27: 365-380.
- Natsch, A.; Keel, C.; Pflirter, H.A.; Haas, D. and Défago, G. 1994. Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 introduced into soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2553-2560.
- Natsch, A.; Keel, C.; Troxler, J.; Zala, M.; Von Albertini, N. and Défago, G. 1996. Importance of preferential flow and soil management in vertical transport of a biocontrol strain of *Pseudomonas fluorescens* in structures field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 33-40.
- Nautiyal, C.S. 1997. Rhizosphere competence of *Pseudomonas* sp. NBRI9926 and *Rhizobium* sp. NBRI9513 involved in the suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 145-158.
- Navarro, E.; Simonet, P.; Normand, P. and Bardin, R. 1992. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Arch. Microbiol.* 157: 107-115.
- Neale, M. and Newton, P. 1999. Registration/Regulatory requirements in Europe. Pp. 443-471. A: Hall, F.R. and Menn, J.J.; (eds). *Methods in Biotechnology*, vol. 5: Biopesticides: Use and Delivery. Humana Press. Totowa, N.J.
- Nei, M. and Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. USA*. 76: 5269-5273.
- Nielsen, K.K.; Nielsen, J.E.; Madrid, S.M. and Mikkelsen, J.D. 1997. Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. *Plant. Physiol.* 113: 83-91.
- Nielsen, M.N. and Sorensen, J. 1999. Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 217-227.
- Nielsen, M.N.; Sorensen, J.; Fels, J. and Pedersen, H.C. 1998. Secondary metabolite and endochitinase-dependent

- antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563-3569.
- Noolandii, J. 1992. Theory in DNA gel electrophoresis. V. 5 Pp 1-57. A: A. Chrambach, M.J. Dunn and B. J. Rafola (eds). *Adv. Electrophoresis*. VCH Weinheim. Germany.
- Normand, P.; Cournoyer, B.; Simonet, P. and Nazaret, S. 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene* 111: 119-124.
- Normander, B.; Hendriksen, N.B. and Nybroe, O. 1999. Green fluorescent protein marked *Pseudomonas fluorescens*: localisation, viability, and activity in the natural barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:646-4651.
- Notz, R.; Maurhofer, M.; Schnider-Keel, U.; Duffy, B.; Haas, D. and Défago, G. 2001. Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathology* 91: 873-881.
- Nowak-Thompson, B.; Gould, S.J. and Loper, J.E. 1997. Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf.5. *Gene* 204: 17-24.
- Nowak-Thompson, B.; Gould, S.J.; Kraus, J. and Loper, J.E. 1994. Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Can. J. Microbiol.* 40: 1064-1066.
- Nowak-Thomson, B.; Chaney, N.; Wing, J.S.; Gould, S.J. and Loper, J.E. 1999. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 181: 2166-2174.

O

- Oberhänsli, T.; Défago, G. and Haas, D. 1991. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *J. General. Microbiol.* 137: 2273-2279.
- Okon, Y.; Bloembergen, G. V. and Lugtenberg, B.J.J. 1998. Biotechnology of biofertilization and phytostimulation. Pp. 327-349. A: Altman (ed.). *Agricultural biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Oliver, J.D.; McDougald, D.; Barret, T.; Glover, L.A. and Prosser, J.I. 1995. Effect of temperature and plasmid carriage on nonculturability in organisms targeted for release. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17: 229-238.
- Ospina-Giraldo, M.D.; Royse, D.J.; Chen, X. and Romaine, C.P. 1998. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. *Phytopathology* 89: 308-313.
- O'Sullivan, D.J. and O'Gara, F. 1992. Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56: 662-676.

P

- Palleroni, N. 1992. Present situation of the taxonomy of aerobic Pseudomonads. Pp. 105-115. A: Galli, E.; Silver, S. And Wiltholt (eds). *Pseudomonas: Molecular biology and biotechnology*. ASM. Washington, D.C.
- Palleroni, N.J. 1984. Genus I *Pseudomonas*. Pp.141-199. A N.R. Krieg and J. G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams&Wilkins Co.; Baltimore.
- Palleroni, N.J. 1986. Introduction to the family Pseudomonadaceae. Pp. 655-665. A: Starr, M.P.; Stolp, H.; Trüper, H.G.; Ballows, A. and Schelegel, H.G. (eds.). *The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Springer-Verlag. New York.
- Palleroni, N.J. 1993. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 64: 231-251.
- Palleroni, N.J. and Doudoroff, M. 1972. Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 10: 73-100.
- Palleroni, N.J.; Bradbury, J.F. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) *Swings et al.* 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 606-609.
- Palleroni, N.J.; Kunisava R.; Contopoulou R. and Doudoroff, M. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 333-339.
- Palmer D.A. and Bender C.L. 1993. Effects of environmental and nutritional factors on production of the polyketide phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 5:1619-1626.
- Palmer, K.M. and Young, J.P.W. 2000. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in Arable soils than in grass soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2245-2450.
- Pantucek, R.; G otz, F.; Doskar, J. and Royspal, S. 1996. Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase-positive *Staphylococcus* species estimated by restriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 46: 216-222.
- Paulitz, T.C. 1991. Effect of *Pseudomonas putida* on the stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatiles of pea and soybean. *Phytopathology* 83: 1223-1228.
- Pengnoo, A.; Kusongwiriawong, C.; Nilratana, L. and Kanjanamaneesthian, M. 2000. Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *BioControl* 45: 245-256.
- Penyalver, R.; Garcia, A.; Ferrer, A.; Bertolini, E. and López, M.M. 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2673-2677.
- Pfender, W.J.F.; Kraus, J. and Loper, J.E. 1993. A genomic region from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 required for pyrrolnitrin production and inhibition of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat straw. *Phytopathology* 83: 1223-1228.
- Picard, C. Di Cello, F.; Ventura, M. ; Fani, R. and Guckert, a. 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 948-955.
- Pierson III, L. and Pierson, E.A. 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiol. Lett.* 136: 101-108.
- Pierson III, L..S.; Wood, V.D. and Wood, D.W. 1998. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 207-225.

- Pierson III, L.S. 1998. Genetic analysis of selected antifungal metabolites produced by *Pseudomonas aureofaciens*. Pp. 355-391. A: Boland, G.J. and Kuykendall, L.D. (eds.). Plant-microbe interactions and biological control. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Pierson III, L.S. and Ishimaru, C.A. 2001. Genomics of Plant-associated bacteria: a glimpse of the future that has become reality. The American Phytopathology Society. APS net. <http://www.apsnet.org>.
- Pierson III, L.S.; Gaffey, T.; Lam, S. and Gong, F. 1995. Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. FEMS Microbiol. Let. 134: 299-307.
- Pierson III, L.S.; Keppenne, V.D. and Wood, D.W. 1994. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by *phzR* in response to cell density. J. Bacteriol. 176: 3966-3974.
- Pieterse, C.M.; van Wees, S.C.M.; Hoffland, E.; van Pelt, J.A. and van Loon, L.C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. Plant-Cell 8: 1225-1237.
- Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends Plant Sci. 4: 52-58.
- Pisabarro, A.; Correia, A. and Martín, J.F. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of *Rhodococcus fascians*: genome size and linear and circular replicon composition in virulent and avirulent strains. Current Microbiol. 36: 302-308.
- Plimmer, J.R. 1999. Analysis, monitoring, and some regulatory implications. Pp. 529-552. A: Hall, F.R. and Menn, J.J.; (eds). Methods in Biotechnology, vol. 5: Biopesticides: Use and Delivery. Humana Press. Totowa, N.J.
- Ponsonnet, C. and Nesme, X. 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. Arch. Microbiol 161: 300-309.
- Ponti, I. and Laffi, P. 1988. Malattie crittogamiche delle piante da frutto. L'informatore Agrario. Verona 215 pp.
- Poussier, S. and Luisetti. 2000. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by nested-PCR-RFLP. Eur. J. Plant Pathol. 106: 255-265.
- Powell, K.A. 1993. The commercial exploitation of microorganisms in agriculture. Pp. 441-459. A: Jones D. G. (eds.). Exploitation of microorganisms. Chapman and Hall, University press, Cambridge.
- Prosser, J.I. 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered microorganisms in the environment. Microbiology 140: 5-17.
- Psallidas, P.G. and Tsiantos, J. 2000. Chemical control of fire blight. Pp.199-234. A: Fire Blight. The disease and its causant agent, *Erwinia amylovora*. Vaneste J.L. (ed). CABI Publishing . UK.

R

- Raaijmakers, J.M. and Weller, D.M. 1998. Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in Take-All Decline Soils. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 144-152.
- Raaijmakers, J.M. and Weller, D.M. 2001. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. Characterization of superior root-colonizing *p. fluorescens* strain Q8r1-96. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2545-2554.
- Raaijmakers, J.M.; Bonsall, R.F. and Weller, D. 1999a. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. Phytopathology 89: 470-475.
- Raaijmakers, J.M.; Hayes, K.; Tomashow, L.S. and Weller, D.M. 1999b. Diversity and rhizosphere competence of 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl)-producing strains. Abstract. 89: S63.
- Raaijmakers, J.M.; Leemen, M.; van Oorschot, M.M.P.; van der Sluis, I.; Schippers, B. and Bakker, P.A.H.M. 1995. Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. Phytopathology 85: 1075-1081.
- Raaijmakers, J.M.; Weller, D.M. and Thomashow, L.S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. Appl. Environ. Microbiol. 63: 881-887.
- Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J. 1998. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. A: <http://www.msu.edu/user/debruijn/dna1-4.htm>
- Ragsdale, N.N. and Sisler, H.D. 1994. Social and political implications of managing plant disease with decreased availability of fungicides in the United States. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 545-557.
- Rahme, L.G.; Tan, M.V.; Le, L.; Wong, S.M.; Tompkin, R.G.; Calderwood, S.W. and Ausbel, F.M. 1997. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. Proc. Nat. Acad. Science USA 94: 13245-13250.
- Rainey, P.B. and Bailey, M.J. 1996. Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome. Mol. Microbiol. 19: 521-533.
- Rainey, P.B. and Travisano, M. 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. Nature 394: 69-72.
- Rainey, P.B.; Bailey, M.J. and Thompson, I.P. 1994a. Phenotypic and genotypic diversity of fluorescent pseudomonads isolated from field-grown sugar beet. Microbiology 140: 2315-2331.
- Rainey, P.B.; Thompson, I.P. and Palleroni, N.J. 1994b. Genetic and fatty acid analysis of *Pseudomonas stutzeri*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 54-61.
- Ramaiah, N.; Hill, R.T.; Chun, J.; Ravel, J.; Matte, M.H.; Staube, W.L. and Colwell, R.R. 2000. Use of a *ChiA* probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay. FEMS Microbiol. Ecol. 34: 63-71.
- Ramette, A.; Moëgne-Lozoc, Y. and Défago, G. 2001. Polymorphism of the polyketide synthase gene *phlD* in biocontrol fluorescent Pseudomonads producing 2,4-diacetylphloroglucinol and comparison of PhlD with plant polyketide synthases. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 639-652.
- Ratnaningsih, E.; Dharmsthithi, S.; Krishnapillai, V.; Morgan, A.; Siclair, M. and Holloway, B.W. 1990. A combined physical and genetic map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. J. Gen. Microbiol. 136: 2351-2357.
- Rattray, E.A.S.; Tyrrell, J.A.; Prosser, J.I.; Glover, L.A. and Killham, K. 1993. Effect of soil bulk density and temperature on wheat rhizosphere colonization by *lux*-marked *Pseudomonas fluorescens*. Eur. J. Soil Biol. 29: 73-82.
- Rich, J.J.; Kinscherf, T.G.; Kitten, T. and Wills, D.K. 1994. Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol 176: 7468-7475.
- Riley, M.S.; Cooper, V.S.; Lanski, R.E.; Forney, L.J. and Marsh, T.L. 2001. Rapid phenotypic change and diversification of a soil bacterium during 1000 generations of experimental evolution. Microbiology 147: 995-1006.
- Roberts, P.D.; Jones, J.B.; Chandler, C.K.; Stall, R.E. and Berger, R.D. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. Plant Dis. 80: 1283-1288.

- Roder, M.S.; Sorells, M.E. and Tanskey, S.D. 1992. 5S ribosomal gene clustered in wheat; pulsed-field gel electrophoresis reveals a high degree of polymorphisms. *Mol. Gen. Genetics* 232: 215-220.
- Rodrigo, A.G.; Borges, K.M. and Bergquist, P.L. 1994. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic digest of *Thermus* strains and its implications for taxonomic and evolutionary studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 547-552.
- Rodriguez-Kabana, R.; Godoy, G.; Morgan-Jones, G. and Shelby, R.A. 1983. The determination of soil chitinase activity: conditions for assay and ecological studies. *Plant soil.* 75: 95-106.
- Römmling, U. and Tümmler, B. 1991. The impact of two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis techniques for the consistent and complete mapping of bacterial genomes: refined physical map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Nucl Acid Res.* 19: 3199-3206.
- Römmling, U. and Tümmler, B. 1994. Bacterial genome analysis by PFGE techniques. Pp. 355-406. A: A. Chrumbach, M.J. Dunn and B. J. Rafola (eds). *Adv. Electrophoresis.* VCH Weinheim. Germany.
- Römmling, U.; Grothues, D.; Bautsch, W. and Tümmler, B. 1989. A physical genome map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *EMBO* 4081-4089.
- Römmling, U.; Schmidt, K.D. and Tümmler, B. 1997. Large chromosomal inversions occurs in *Pseudomonas aeruginosa* clone C strain isolated from cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 145-146.
- Rosales, A.M.; Tomashow, L.; Cook, R.J. and Mew, T.W. 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85: 1028-1032.
- Roselló, R.; Garcia-Valdes, E.; Lalucat, J. and Ursing, J. 1991. Genotypic and phenotypic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *System. Appl. Microbiol.* 14: 150-157.
- Ross, I.L.; Alami, I.; Harvey, P.R.; Achouack, W. and Ryder, M.H. 2000. Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related pseudomonads isolated from wheat field soils in South Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1609-1616.
- Ruz, L. 1999. Caracterització *in vitro* i *in vivo* de soques de *Pseudomonas fluorescens* i *Erwinia herbicola*, promotores de creixement en espècies de portaempelts de fruiters. Treball pràctic del master de Biotecnologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.
- Ryder, M.H. 1995. Monitoring of biocontrol agents and genetically engineered microorganisms in the environment: Biotechnological approaches. Pp. 475-492. A: Rudra P. Shing and Uma S. Shing (eds). *Molecular methods in plant pathology.* CRC Press, Inc.
- Ryu, E. 1940. A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 17: 58-93.

S

- Sacherer, P.; Défago, G. and Hass, D. 1994. Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett.* 16:155-160.
- Salama, S.M.; Garcia, M.M. and Taylor, D.E. 1992. Differentiation of subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 12: 446-450.
- Sarniguet, A.K.; Henkels, M.D.; Muehlchen, A.M. and Loper, J.E. 1995. The sigma factor σ^S affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 12255-12259.
- Schaad, N.W.; Cheong, S.S.; Tamaki, S.; Hatziloukas, E. and Panopoulos, N.J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85: 243-248.
- Schena, L.; Ippolito, A.; Zahavi, T.; Cohen, L. and Droby, S. 2000. Molecular approaches to assist the screening and monitoring of postharvest biocontrol yeast. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 681-691.
- Schisler, D.A. and Slininger, P.J. 1997. Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial control products. *J. Indus. Microbiol. Biotec.* 19: 172-179.
- Schnabel, E.L. and Jones, A.L. 1999. Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4898-4907.
- Schnider, U.; Keel, C.; Blumer, C.; Troxler, J.; Défago, G. and Haas D. 1995a. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.* 177: 5387-5392.
- Schnider, U.; Keel, C.; Voisard, C.; Défago, G. and Haas, D. 1995b. Tn5-directed cloning of *pqq* genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Mutational inactivation of the genes result in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3856-3864.
- Schnider-Keel, U.; Seematter, A.; Maurhofer, M.; Blumer, C.; Duffy, B.; Gigot-Bonefoy, C.; Reimann, C.; Notz, R.; Défago, G.; Haas, D. and Keel, C. 2000. Autoinduction of 2,4 diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* 182: 1215-1225.
- Schroth, M.N.; Hildebrand, D.C. and Starr, M.P. 1986. Phytopathogenic members of the genus *Pseudomonas*. Pp. 701-718. A: Starr, M.P.; Stolp, H.; Trüper, H.G.; Ballows, A. and Schelegel, H.G. (eds.) *The prokaryotes. A handbook on habitats, Isolation, and identification of bacteria.* Springer-Verlag. New York.
- Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulsed-field gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47-56.
- Sentchillo, V.S.; Perebituk, A.N.; Zehnder, A.J.B. and Van Der Meer, J. R. 2000. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and Xylene metabolism in *Pseudomonas* strains isolated from different contaminated sites in Belarus. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2842-2857.
- Shah, S.; Li, J.; Moffatt, B.A. and Glick, B.R. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 44: 833-843.
- Shanahan, P.; O'Sullivan, D.J.; Simpson, P. Glenon, J.D. and O'Gara, F. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonads and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 353-358.
- Sharifi-Tehrani, A.; Zala, M.; Natsch, A.; Moenne-Loccoz, Y. And Défago, G. 1998. Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of

- amplified 16S DNA. Eur. J. Plant. Pathol. 104: 631-643.
- Shingh, P.P.; Shin, I.C.; Park, C.S.; and Chung, I.R. 1999. Biological control of fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89: 92-99.
- Shiomi, Y.; Nishiyama, M.; Onizuka, T. and Marumoto, T. 1999. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3996-4001.
- Simon, A. and Ridge, E.H. 1974. The use of ampicillin in a simplified selective medium for the isolation of fluorescent pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.* 37: 459-460.
- Simon, A. and Sivasithamparan, K. 1989. Pathogen suppression; a case study of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in soil. *Soil. Biol. Biochem.* 21: 331-337.
- Smith, C.L.; Klco, S.R. and Cantor, C.R. 1988. Pulsed field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. Pp. 41-72. A: K. Davis (eds). *Genome analysis: a practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Smith, J.J.; Offord, L.C.; Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (Synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4263-4268.
- Smith, K.P. and Goodman, R.M. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 473-491.
- Smith, K.P.; Handelsman, J. and Goodman, R.M. 1997. Modeling dose-response relationship in biological control: Partitioning host responses to the pathogen and biocontrol agent. *Phytopathology* 87: 720-729.
- Sneath, P.H.A. 1966. Identification methods applied to *Chromobacterium*. Pp. 15-20. A: Gibbs, B.M. and Skinner, F.A. (eds.). *Identification methods for microbiologist, part A*. Academic Press, London.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman & Co.; San Francisco.
- Sobieczewski, P.; Deckers, T. and Pulawska, J. 1997. Fire blight (*Erwinia amylovora*). Some aspects of epidemiology and control. (Review of recent literature). Phare Partnership and Institution Building program.
- Southern, E.M.; Anand, R.; Brown, W.R. and Fletcher, D.S. 1987. A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 15: 5925-5942.
- Spiers, A.J.; Buckling, A. and Rainey, P.B. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146:2345-2350.
- Spletzer, M.E. and Enyedi, A. J. 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology* 89: 722-727.
- Stanier, R.Y.; Palleroni, N.J. and Doudoroff, M. 1966. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.
- Staswick, P.E. and Lehman, C.C. 1999. Jasmonic acid-signaled responses in plants. Pp. 117-136. A: Agrawal, A.A.; Tuzun, S. and Bent, E. (eds). *Induced plant defenses against pathogens and herbivores*. The American Phytopathology Society. Press, St. Paul, Minnesota
- Stead, P.; Rudd, B.A.M.; Bradshaw, H.; Noble, D. and Dawson, M.J. 1996. Induction of phenazine biosynthesis in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* by L-N- (3- Oxo-hexanoyl)homoserine lactone. *FEMS Microbiol. Let.* 140: 15-22.
- Stenier, P. W. 1989. Predicting canker, shoot and trauma blight phases of apple fire blight epidemics using the MARYBLYT model. *Acta Horticulturae* 273: 49-58.
- Stern, M.J.; Ferro-Luzzi, G. Smith, N.H.; Robison, E.C. and Higgins, C.F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37: 1015-1026.
- Sticher, L.; Mauch-Mani, B. and Métraux, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.
- Stolp, H. and Gadkari, D. 1986. Nonpathogenic members of the genus *Pseudomonas*. Pp. 719-741. A: Starr, M.P.; Stolp, H.; Trüper, H.G.; Ballows, A. and Schelegel, H.G. (eds.). *The prokaryotes. A handbook on habitats, Isolation, and identification of bacteria*. Springer-Verlag. New York.
- Stover, R.H. 1962. Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other Musa species. *CMI Phytopatol. Pap.* 4: 117.
- Stuurman, N.; Bras, C.P.; Schlaman, R.M.H.; Wijffes, A.H.M.; Bloemberg, G. and Spaink, H.P. 2000. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 11: 1163-1169.
- Sutra, L.; Siverio, F.; López, M.M.; Hunault, G.; Bollet, C. and Gardan, L. 1997. Taxonomy of *Pseudomonas* strains isolated from tomato Pith Necrosis: emended description of *Pseudomonas corrugata* and proposal of three unnamed fluorescent *Pseudomonas* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1020-1033
- Sutton, J.C. and Peng, G. 1993. Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 473-493.
- Sutton, T.B. 1996. Chancing options for the control of deciduous fruit tree diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 527-547.
- Suzuki, Y.; Ishihara, M.; Funabashi, M.; Suzuki, R.; Isomura, S. and Yokochi, T. 1993. Pulsed-field gel electrophoretic analysis of *Campylobacter jejuni* DNA for use in epidemiological studies. *J. Inf.* 27: 32-42.
- Swanto, A. and Klapan, S. 1989. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter spahaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.* 171: 5850-5859.
- Swings, J.; De Vos, P.; Van den Mooter, M.; De Ley, J. 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* (Hugh 1981) to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 409-413.

T

- Tally, A.; Oostendorp, m.; Lawton, K.; Staub, T. and Bassi, B. 1999. Commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens. Pp.357-369. A: Agrawal, A.A.; Tuzun, S. and Bent, E. (eds). *Induced plant defenses against pathogens and herbivores*. The American Phytopathology Society. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Tamplin, M.L.; Jackson, J.K.; Buchrieser, C.; Murphree, R.L.; Portier, K.M.; Gangar, V.; Miller, L.G. and Kaspar, C.W. 1996. Pulsed-field gel electrophoresis and ribotype profiles of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3572-3580.
- Tannock, G. W.; Tisala-Timisjarvi, A, Rodtong, S.; Ng, J.; Munro, K. and Alatosava, T. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4264-4267.
- Tanskanen, E.I.; Tulloch, D.L.; Hillier, A.J. and Davidson, B.E. 1990. Pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I digest of Lactococcal genomic DNA, a novel method of strains identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 305-3111.

- Tcherneva, E.; Rijpens, N.M. Jerseck, B. and Herman, L.M.F. 2000. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Appl. Microbiol.* 88: 69-80.
- Tesar, M.; Hoch, C.; Moore, E.R.B. and Timmis, K. N. 1996. Westprinting: Development of a rapid immunochemical identification for species within the genus *Pseudomonas* (sensu stricto). *System. Appl. Microbiol.* 19: 577-588.
- Tharaud, M.; Laurent, J. Faize, M. and Paulin, J. 1997. Fire blight protection with avirulent mutants of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 143: 625-632.
- Thiurp, L.; Johnsen, K. and Winding, A. 2001. Succession of indigenous *Pseudomonas* spp. and actinomycetes on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54 and the fungicide imazalil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1147-1153.
- Thomashow, L.S. and Weller, D.M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritrici*. *J. Bacteriol.* 170: 3499-3508.
- Thomashow, L.S. and Weller, D.M. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. Pp. 187-235. A: Gary Stacey and Noel T.Keen (eds). *Plant Microbe Interactions*. Vol 1. Chapman Hall, New York.
- Thompson, I.P.; Ellis, R.E. and Bailey, M.J. 1995. Autoecology of a genetically modified fluorescent pseudomonad on sugar beet. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17: 1-14.
- Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 37-52.
- TIGR. <http://www.tigr.org>
- Timms-Wilson, T.M.; Ellis, R.J.; Renwick, A. Rhodes, D.J.; Mavrodi, D.V.; Weller, D.M.; Thomashow, L.S. and Bailey, M.J. 2000. Chromosomal insertion of phenazine-1-carboxylic acid biosynthetic pathway enhances efficacy of damping-off disease control by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 12: 1293-2000.
- Timmusk, S.; Nicander, B.; Granhall, U. and Tillberg, E. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymixa*. *Soil Biol. Bioch.* 31: 1847-1852.
- Toda, T.; Hyakumachi, M.; Suga, H.; Kageyama, K.; Tanaka, A. and Tani, T. 1999. Differentiation of *Rhizoctonia* AG-D isolates from turfgrass into subgroups I and II based on rDNA and RAPD analyses. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 835-846.
- Tombolini, R.; Van Der Gaag, D.J.; Gerhardson, B. and Jansson, J.K. 1999. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualised by using green fluorescent protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3674-3680.
- Trachuk, L.A.; Revina, L.P., Shemyakina, T.M.; Chestukhina, G.G. and Stepanof, V.M. 1996. Chitinases of *Bacillus licheniformis* B-6839: isolation and properties. *Can. J. Microbiol.* 42: 307-315.
- Tronsmo, A. and Hieljord, L.G. 1998. Biological control with *Trichoderma* species. Pp. 111-123. A: Boland, G.J. and Kuykendall, L.D. (eds) *Plant-microbe interactions and biological control*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Troxler, J., Zala, M., Natsch, A., Moëne-Loco, I. and Défago, G. 1997c. Autoecology of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the rhizosphere and inside roots at later stages of plant development. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 119-130.
- Troxler, J.; Azelvandre, P.; Zala, M.; Défago, G. and Haas, D. 1997a. Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 213-219.
- Troxler, J.; Zala, M.; Moëne-Loco, I.; Keel, C. and Défago, G. 1997b. Predominance of non-culturable cells of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the surface horizon of large outdoors lysimeters. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3776-3782.
- Tuzun, S. and Bent, E. 1999. The role of hydrolytic enzymes in multigenic and microbially-induced resistance in plants. Pp. 95-115. A: Agrawal, A.A.; Tuzun, S. and Bent, E. (eds). *Induced plant defenses against pathogens and herbivores*. The American Phytopathology Society. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Tweddell, R.J.; Jabari-Hare, S.H. and Charest, P.M. 1994. Production of chitinases by *Stachybotrys elegans*, a micoparasite of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 489-495.
- Tynkkynen, S.; Satokari, R.; Saarela, M.; Mattuila-Sandholm, T. and Saxelin, M. 1999. Comparison of ribotyping randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3908-3914.

U

- Utkhede, R.S.; Vrain, T.C. and Yorton, J.M. 1992. Effects of nematodes, fungi and bacteria on the growth of young apple trees grown in apple replant disease soil. *Plant and Soil* 139: 1-6.

V

- Van De Peer, I.; Vancanneyt, M. and De Wachtter, R. 1996. Compilation of Pseudomonad sequences present in a database on the structure of ribosomal RNA. *System. Appl. Microbiol.* 19: 493-500.
- Van der Zwet, T. 1994. The various means of dissemination of the fire blight bacteria *Erwinia amylovora*. *Bull. EPO* 24: 209-214.
- Van der Zwet, T.; Zoller, B.G. and Thomson, S.V. 1988. Controlling fire blight of pear and apple by accurate reduction of blossom blight phase. *Plant Dis.* 72:464:472.
- Van Dijk, K. and Nelson, E.B. 2000. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5340-5347.
- Van Elsas, J.D.; Dijkstra, A.F.; Govaert, J.M. and Van Veen, J.A. 1986. Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of texture in field microplots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 151-160.
- Van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.
- Van Péé, K.; Salcher, O.; Fisher, P.; Bokel, M. and Lingens, F. 1983. The biosynthesis of brominated pyrrolnitrin derivatives by *Pseudomonas aureofaciens*. *J. Antibiot.* 12: 1735-1741.

- Van Peer, R.; Niemann, G.J. and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.
- Van Wees, S.C.M.; de Swart, E.A.M.; Van Pelt, J.A.; Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. USA* 97: 8711-8716.
- Vancanneyt, M.; Torck, U.; Dewettinck, D.; Vaerewijck, M. and Kersters, K. 1996a. Grouping of Pseudomonads by SDS-PAGE of whole cell proteins. *System. Appl. Microbiol.* 19: 556-568.
- Vancanneyt, M.; Witt, S.; Abraham, W-R.; Kersters, K and Fredrickson, H.L. 1996b. Fatty acid content in whole cell hydrolysates and phospholipid fractions of Pseudomonads: a taxonomic evaluation. *System. Appl. Microbiol.* 19: 528-540.
- Vandamme, P.; Holmes, B.; Vancanneyt, M.; Coenye, T.; Hoste, B.; Coopman, R.; Revets, H.; Lauwers, S.; Gillis, M.; Kersters, K. and Govan, J.R.W. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1188-1200.
- Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K. and Swings, J. 1996. Polyphasic Taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.
- Vanneste, J. L. 2000. What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? Pp. 1-6. A: Fire Blight. The disease and its causant agent, *Erwinia amylovora*. Vaneste J.L. (ed). CABI Publishing . UK.
- Vanneste, J.L.; Yu, J. and Beer, S.V. 1992. Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh 252 in biological control of *Erwinia amylovora*. *J. Bacteriol.* 74: 2785-2796.
- Vázquez, M. 1994. Aïllament i caracterització de soques de bacteris epífits per al control biològic de *Pseudomonas syringae* i *Stemphylium vesicarium*. Treball final de carrera. Universitat de Girona.
- Vázquez, M. 1998. Comparació de dos mètodes d'aïllament de bacteris antagonistes de *P. expansum*. Projecte final de carrera. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agària de Lleida.
- Versalovic, J.; Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.
- Versavaud, A.; Courcoux, P.; Roulland, C.; Dulau, L. and Hallet, J.N. 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strain from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3521-3529.
- Vicedo, B.; Peñalver, R.; Asins, M.J. and López, M.M. 1993. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pAgK84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra⁻ mutant strain K1026. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 309-315.
- Vincent, M.N.; Harrison, L.A.; Brackin, J.M.; Kovacevich, P.A.; Mukerji, P.; Weller, D.M. and Pierson, E.A. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2928-2934.
- Viñas, I.; Usall, J.; Teixido, N. and Fons, E. 1996. Successful biological control of the major postharvest diseases on apple and pear with a new strain of *Candida sake*. *Brighton Crop. Protection Conference-Pests & Diseases.* Vol. 2 6C-3: 603-608.
- Voisard, C.; Keel, C.; Haas, D. and Défago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO* 8: 351-358.
- ## W
- Walker, R.; Powell, A.A.; and Seddon, B. 1998. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J. Appl. Microbiol.* 84: 791-801.
- Waltz, M. 1995. Electrophoretic Karyotyping. Pp: 61-73. A: Kück (ed.). *The Mycota II, Genetics and Biotechnology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wang, S. and Chang, W. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-87 in a shrimp and crab shell powe medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 380-386.
- Warren, G. Corotto, L. and Wolver, P. 1986. Conserved repeats in diverged ice nucleations structural genes from two species of *Pseudomonas*. *Nucleic Acids Res.* 14: 8047-8060.
- Weger, L. A.; van Boxtel, R.; van der Burg, B.; Gruters, R.A.; Geels, F.P.; Schippers, B. and Lugtenberg, B. 1986. Siderophores and Outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-simulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.* 165 : 585-594.
- Wei, G.; Kloepper, J.W. and Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance to cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81: 1508-1512.
- Wei, G.; Kloepper, J.W. and Tuzun, S. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant-promoting rhizobacteria under fiels conditions. *Phytopathology* 86: 221-224.
- Wei, W.; Plovanch-Jones, A.; Deng, W.; Jin, Q.; Collmer, A.; Huang, H. and He, S.Y. 2000. The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2247-2252.
- Wei, Z, Kim, J. F. and Beer, S.V. 2000. Regulation of *hrp* genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/Hrp Y, a novel two-component system, and HrpS. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 13: 1251-1262.
- Weller, D.M. 1983. Colonization of wheat roots by fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology* 73: 1548-1553.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol* 26: 379-407.
- Weller, D.M.; Howiw, W.J. and Cook, R.J. 1988. Relationships between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and supression of take-all of wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 78: 1094-1100.
- Welsh, J. and McClelland M. 1991. Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. *Nucleic Acids. Res.* 19: 861-866.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.

- West, N.J. and Adams, D.G. 1997. Phenotypic and genotypic comparison of symbiotic and free-living cyanobacteria from a single field site. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4479-4484.
- West, S.E.H. and Iglewski, B. 1988. Codon usage in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 16: 9323-9335.
- Whatling, C.A.; Hodgson, J.E.; Burnham, M.K.R.; Clarke, N.J.; Franklin, F.C.H. and Thomas C.M. 1995. Identification of a 60 kb region of the chromosome of *Pseudomonas fluorescens* NCIB 10586 required for the biosynthesis of pseudomonic acid (mupirocin). *Microbiology* 141: 973-982.
- Whistler, C. A.; Corbell, N. A.; Sarniguet, A.; Ream, W. and Loper, J.E. 1998. The two component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor σ^S and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 24: 6635-6641.
- Whistler, C.A.; Stockwell, V.O. and Loper, J.E. 2000. Ion protease influences production and UV tolerance of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2718-2725.
- Whitesides, S.K. and Spots, R.A. 1991. Frequency, distribution and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathology* 81: 453-457.
- Widmer, F.; Seidler, R.J.; Gillevet, P.M.; Watrud, L.S. and Di Giovanni, G.D. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2545-2553.
- Wiedmann, M.; Weilmeyer, D.; Dineen, S.S.; Ralyea, R. and Boor, K.J. 2000. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2085-2095.
- Williams, J.G.K.; Kubelic, A.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wilson, C.L. 1997. Biological control and plant diseases- a new paradigm. *J. Indus. Microbiol. Biotec.* 19: 158-159.
- Wilson, Ch. L. and Wisniewski, M.E. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 425-441.
- Wilson, I.J. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3741-3751.
- Wilson, M. 1997. Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. *J. Indus. Microbiol. Biotec.* 19: 188-191.
- Wilson, M. and Lindow, S. E. 1994a. Inoculum density-dependent mortality and colonization of the phyllosphere by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2232-2237.
- Wilson, M. and Lindow, S.E. 1993. Effect of phenotypic plasticity on epiphytic survival and colonization by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 410-416.
- Wilson, M. and Lindow, S.E. 1994b. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (Ice⁺) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice nucleating (Ice⁻) biological control agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3128-3137.
- Wilson, M.; Epton, H.A.S. and Sigeo, D.C. 1992. Interactions between *Erwinia herbicola* and *E. amylovora* on the stigma of hawthorn blossoms. *Phytopathology* 82: 914-918.
- Wissing, F. 1974. Cyanide formation from oxydation of glycine by *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 121: 1289-1294.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wood, D.W. and Pierson III, L.S. 1996. The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene* 168: 49-53.
- Wood, D.W.; Gong, F.; Daykin, M.M.; Williams, P. and Pierson III, L.S. 1997. N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.* 179: 7663-7670.

X

- Xiao, Y.; Hev, S.; Yi, J.; Lu, Y. and Hutchenson, S.W. 1994. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J. Bacteriol.* 176: 1025-1036.

Y

- Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Yano, I.; Hotta, H. and Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Durodoff 1973) comb. nov.; *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) com. nov. *Microbiol. Immunol.* 39: 897-904.
- Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Yano, I.; Hotta, H.; Hashimoto, Y.; Ezaki, T. and Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 39: 897-904.
- Yakoby, N.; Zhou, R.; Kobiler, I.; Dinoor, A. and Prusky, D. 2001. Development of *Colletotrichum gloeosporoides* restriction enzyme-mediated integration mutants as biocontrol agents against anthracnose disease in avocado fruits. *Phytopathology* 91: 143-148.
- Yamamoto, S.; Kasai, H.; Arnold, D.L.; Jackson, R. W.; Vivian, A. and Harayama, S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenetic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146:2385-2394.
- Yoshida, S.; Hiradate, S.; Tsukamoto, T.; Hatakeda, K. And Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91: 181-187.
- Young, J.M.; Bull, C.T.; de Boer, S.H.; Firrao, G.; Gardan, L.; Saddler, G.E.; Stead, D.E. and Takikawa, Y. 2001. Classification, nomenclature, and plant pathogenic bacteria-a clarification. *Phytopathology* 91: 617-620.
- Yuan, Z.; Cang, S.; Matsufuji, M.; Nakata, K.; Nagamatsua, Y. and Yoshimoto, A. 1998. High production of pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas fluorescens* S272 grown on ethanol as a sole carbon source. *J. Ferm. Bioeng* 86: 559-563.
- Yuen G. C.; Craig, M.L.; Kerr, E.D. and Steadman J. R. 1994. Influences of antagonist population levels, blossom development stage, and canopy temperature on the inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* on dry edible bean by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology* 84: 495-501.

Z

- Zaat, S.A.J.; Slegtenhorts-Eegdeman, K.; Tommassen, J.; Geli, V.; Wiffelman, C.A. and Lugtenberg, B.J.J. 1994. Construction of *phoE-caa*, a novel PCR-and immunologically detectable marker gene for *Pseudomonas putida*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3965-3973.
- Zala, M.; Sharifi-Tehrani, A.; Nastch, A.; Moënné-Loccoz, Y. and Défago, G. 1997. Biocontrol of fungal root diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. Fifth IOBC/EFPP Workshop. Molecular approaches in biological control. Abstract.
- Zhang, J.H.; Quigley, N.B. and Gross, D.C. 1995. Analysis of the *syrB* and *syrC* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by thiotemplate mechanism. J. Bacteriol. 177: 4009-4020.
- Zhang, Y. and Geider, K. 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed field gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4421-4426.
- Zhang, Y.; Bereswill, S. and Geider, K. 1996. Differentiation of *Erwinia amylovora* by PCR and PFGE analysis. Phytopathology 86:S12.
- Zhang, Z. and Pierson III, L.S. 2001. A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4305-4315.
- Zhang, Z. and Yuen, G.Y. 2000. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. Phytopathology 90: 384-389.
- Zhang, Z.; Yuen, G.Y.; Sarath, G. And Penheiter, A.R. 2001. Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. Phytopathology 91: 204-211.
- Zijlstra, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. haplos* based on SCAR-PCR, a powerful way to enabling reliable identification of populations that share common traits. Eur. J. Plant Pathol. 106: 283-290.
- Zimand, G.; Elad, I. and Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathology 86: 1225-1260.
- Zingg, B.; Anderson, J. F.; Johnson, R. C. and LeFebvre, R.B. 1993. Comparative analysis of genetic variability among *Borrellia burgdorferi* isolates from Europe and The United States by restriction enzyme analysis, gene restriction fragment length polymorphism, and pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 31: 3115-3122.

Annex 1

Taula 1.1 Soques utilitzades en aquest treball procedents del socari de l'INTEA.
Table 1.1 Strains used in this study pertaining to INTEA.

Aïllat*	Espècie hoste	Localitat	Comarca	1	2	Any aïllament
2M	<i>Pyrus communis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	F	P	1996
16M	<i>Pyrus communis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fr	P	1996
17M	<i>Pyrus communis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fr	P	1996
23M	<i>Pyrus communis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fr	P	1996
26M	<i>Pyrus communis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fr	P	1996
45M	<i>Pyrus communis</i>	Riudellots	La Selva	Fr	P	1996
58M	<i>Pyrus communis</i>	Riudellots	La Selva	Fr	P	1996
59M	<i>Pyrus communis</i>	Riudellots	La Selva	Fr	P	1996
65M	<i>Pyrus communis</i>	Riudellots	La Selva	Fr	P	1996
160M	<i>Pyrus communis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fr	P	1996
167M	<i>Pyrus communis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fr	P	1996
251M	<i>Pyrus malus</i>	Riudellots	La Selva	Fr	P	1996
260M	<i>Vitis vitifera</i>	Pals	Baix Empordà	F	C	1996
268M	<i>Vitis vitifera</i>	Pals	Baix Empordà	F	C	1996
287M	<i>Prunus avium</i>	Pals	Baix Empordà	F	C	1996
300M	<i>Medicago sativa</i>	Pals	Baix Empordà	F	C	1996
309M	<i>Medicago sativa</i>	Pals	Baix Empordà	F	C	1996
315M	<i>Vitis vitifera</i>	Pals	Baix Empordà	F	C	1996
325M	<i>Vitis vitifera</i>	Pals	Baix Empordà	F	C	1996
200	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
201	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
202	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
203	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
204	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
205	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
206	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
207	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
208	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
209	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
210	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
211	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
212	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
213	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
214	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
215	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
216	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
217	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
218	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
219	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
220	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
221	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
222	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
223	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
224	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
225	<i>Anthylis montana</i>	Girona	Gironès	A	M	1993
227	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
228	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
229	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
230	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
231	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
232	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
233	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
234	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
235	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
236	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
237	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
238	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
239	<i>Pyrus communis</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
240	<i>Triticum aestivum</i>	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
241	<i>Triticum aestivum</i>	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
242	<i>Triticum aestivum</i>	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
243	<i>Triticum aestivum</i>	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
244	<i>Prunus spinosa</i>	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
245	<i>Prunus spinosa</i>	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
246	<i>Prunus spinosa</i>	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
247	<i>Prunus spinosa</i>	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993

Continuació/Continuation

Aïllat*	Espècie hoste	Localitat	Comarca	1	2	Any aïllament
248	<i>Malus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
249	<i>Malus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
250	<i>Malus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
251	<i>Malus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
252	<i>Malus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
253	<i>Malus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
254	<i>Malus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	A	P	1993
256	<i>Malus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	A	C	1993
257	<i>Malus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	A	C	1993
258	<i>Malus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	A	C	1993
259	<i>Malus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	A	C	1993
260	<i>Malus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	A	C	1993
261	<i>Malus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	A	C	1993
262	<i>Malus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	A	C	1993
263	<i>Fagus sylvatica</i>	Puig Neulós		A	nd	93
264	<i>Fagus sylvatica</i>	Puig Neulós		A	nd	93
265	<i>Tryfolium</i>	Setcases	Ripollés	A	M	1993
266	<i>Fagus sylvatica</i>	Setcases	Ripollés	A	C	1993
267	<i>Tryfolium</i>	Setcases	Ripollés	A	M	1993
268	<i>Tryfolium</i>	Setcases	Ripollés	A	M	1993
269	<i>Tryfolium</i>	Setcases	Ripollés	A	M	1993
270	<i>Carex</i>	Coll de Merolla		A	M	1993
271	<i>Carex</i>	Coll de Merolla		A	M	1993
272	<i>Carex</i>	Coll de Merolla		A	M	1993
273	<i>Carex</i>	Coll de Merolla		A	M	1993
274	<i>Luzula</i>	Fageda d'en Jordà	Garrotxa	A	M	1993
275	<i>Luzula</i>	Fageda d'en Jordà	Garrotxa	A	M	1993
276	<i>Luzula</i>	Fageda d'en Jordà	Garrotxa	A	M	1993
277	<i>Luzula</i>	Fageda d'en Jordà	Garrotxa	A	M	1993
278	Papilionàcia	Setcases	Ripollés	A	M	1993
279	Papilionàcia	Setcases	Ripollés	A	M	1993
280	<i>Medicago sativa</i>	Sant Jaume de Llierca	Garrotxa	A	C	1993
281	<i>Medicago sativa</i>	Sant Jaume de Llierca	Garrotxa	A	C	1993
282	<i>Medicago sativa</i>	Sant Jaume de Llierca	Garrotxa	A	C	1993
283	<i>Medicago sativa</i>	Sant Jaume de Llierca	Garrotxa	A	C	1993
284	<i>Avena vulgare</i>	Sant Jaume de Llierca	Garrotxa	A	C	1993
285	<i>Avena vulgare</i>	Sant Jaume de Llierca	Garrotxa	A	C	1993
286	<i>Avena vulgare</i>	Sant Jaume de Llierca	Garrotxa	A	C	1993
287	<i>Avena vulgare</i>	Sant Jaume de Llierca	Garrotxa	A	C	1993
288	<i>Zea Mays</i>	Aiguamolls de l'Empordà	Alt Empordà	A	C	1993
289	<i>Zea Mays</i>	Aiguamolls de l'Empordà	Alt Empordà	A	C	1993
290	<i>Zea Mays</i>	Aiguamolls de l'Empordà	Alt Empordà	A	C	1993
291	<i>Zea Mays</i>	Aiguamolls de l'Empordà	Alt Empordà	A	C	1993
292	<i>Zea Mays</i>	Aiguamolls de l'Empordà	Alt Empordà	A	C	1993
293	<i>Quercus ilex</i>	Cassa de la Selva	Gironès	A	B	1993
294	<i>Quercus ilex</i>	Cassa de la Selva	Gironès	A	B	1993
296	<i>Vitis Vitifera</i>	Sant Climent	Alt Empordà	A	C	1993
297	Gramínia	Setcases	Ripollés	A	M	1993
298	Gramínia	Setcases	Ripollés	A	M	1993
299	Gramínia	Setcases	Ripollés	A	M	1993
300	Gramínia	Vall Ter	Ripollés	A	M	1993
301	Gramínia	Vall Ter	Ripollés	A	M	1993
302	Gramínia	Vall Ter	Ripollés	A	M	1993
303		Setcases	Ripollés	A	M	1993
304	<i>Sarotamnus</i>	Setcases	Ripollés	A	M	1993
305	<i>Sarotamnus</i>	Setcases	Ripollés	A	M	1993
306	<i>Sarotamnus</i>	Setcases	Ripollés	A	M	1993
307	<i>Sarotamnus</i>	Setcases	Ripollés	A	M	1993
308	<i>Trigonella</i>	Coll de Merolla		A	M	1993
309	<i>Trigonella</i>	Coll de Merolla		A	M	1993
310	<i>Trigonella</i>	Coll de Merolla		A	M	1993
311	<i>Trigonella</i>	Coll de Merolla		A	M	1993
312	<i>Trigonella</i>	Coll de Merolla		A	M	1993
313	<i>Solanum lycopersicum</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
314	<i>Solanum lycopersicum</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
315	<i>Solanum lycopersicum</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
317	<i>Nicotiana tabacum</i>	Girona	Gironès	A	H	1993
318	<i>Nicotiana tabacum</i>	Girona	Gironès	A	H	1993
319	<i>Capsicum annuum</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
320	<i>Capsicum annuum</i>	Girona	Gironès	A	C	1993
321	<i>Capsicum annuum</i>	Girona	Gironès	A	C	1993

Continuació/Continuation

Aïllat*	Espècie hoste	Localitat	Comarca	1	2	Any aïllament
323	<i>Helianthus annuus</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
324	<i>Helianthus annuus</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
325	<i>Helianthus annuus</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
326	<i>Lactuca sativa</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
327	<i>Lactuca sativa</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
328	<i>Lactuca sativa</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
329	<i>Medicago sativa</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
330	<i>Medicago sativa</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
331	<i>Medicago sativa</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
332	<i>Medicago sativa</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
333	<i>Medicago sativa</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
334	<i>Zea mays</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
335	<i>Zea mays</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
336	<i>Zea mays</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
337	<i>Zea mays</i>	Fornells de la Selva	Gironès	A	C	1993
338	<i>Pyrus</i> sp.	Calonge	Baix Empordà	F	C	1993
339	<i>Prunus</i> sp.	nd	(Lleida)	B	C	1993
340	<i>Prunus</i> sp.	nd	(Lleida)	B	C	1993
341	<i>Prunus</i> sp.	nd	(Lleida)	T	C	1993
342	<i>Prunus</i> sp.	nd	(Lleida)	B	C	1993
343	<i>Prunus</i> sp.	nd	(Lleida)	T	C	1993
344	<i>Vitis vitifera</i>	nd	(Àlava)	B	C	1988
345	nd	nd	nd	nd	nd	nd
346	nd	nd	nd	nd	nd	nd
347	<i>Pyrus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	B	P	1988
348	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
349	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
350	<i>Pyrus</i> sp.	nd	nd	nd	nd	nd
351	<i>Pyrus</i> sp.	nd	nd	nd	nd	nd
352	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1987
353	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1987
354	<i>Vitis vitifera</i>	nd	(Àlava)	B	C	1988
355	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1987
356	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
357	<i>Pyrus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	B	P	1998
358	<i>Vitis vitifera</i>	nd	(Àlava)	B	C	1988
359	<i>Pyrus</i> sp.	nd	nd	B	nd	nd
360	<i>Pyrus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	B	P	1988
361	<i>Pyrus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	B	P	1987
362	nd	nd	nd	nd	nd	nd
363	nd	nd	nd	nd	nd	nd
364	<i>Vitis vitifera</i>	nd	(Àlava)	B	C	1988
365	<i>Vitis vitifera</i>	nd	(Àlava)	B	C	1988
366	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1987
367	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
368	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1987
369	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1987
370	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
371	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
372	<i>Pyrus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	B	C	1988
373	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
374	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
375	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
376	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
377	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
378	<i>Pyrus</i> sp.	Girona	Gironès	B	C	1988
379	<i>Veronica persica</i>	Banyoles	Pla de l'Estany	FI	M	1994
380	<i>Diplotaxis erucoides</i>	Banyoles	Pla de l'Estany	FI	M	1994
381	<i>Veronica persica</i>	Banyoles	Pla de l'Estany	FI	M	1994
382	<i>Prunus</i> sp.	Platja d'Aro	La Selva	FI	M	1994
383	<i>Veronica persica</i>	Banyoles	Pla de l'Estany	FI	M	1994
384	Gramínea	Banyoles	Pla de l'Estany	F	M	1994
385	<i>Veronica persica</i>	Banyoles	Pla de l'Estany	FI	M	1994
421	<i>Prunus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	B	P	1994
422	<i>Prunus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	B	P	1994
423	<i>Prunus</i> sp.	Gualta	Baix Empordà	B	C	1994
462	<i>Pyrus</i> sp.	Esponella	Pla de l'Estany	B	P	1994
463	<i>Pyrus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Baix Empordà	B	C	1994
464	<i>Pyrus</i> sp.	Sant Pere Pescador	Baix Empordà	B	C	1994
465	<i>Cydonia oblonga</i>	Sant Pere Pescador	Baix Empordà	B	C	1994
529	<i>Prunus</i> sp.	Viladamat	Alt Empordà	B	M	1994

Continuació/Continuation

Aïllat*	Espècie hoste	Localitat	Comarca	1	2	Any aïllament
530	<i>Pyrus</i> sp.	Verges	Alt Empordà	B	P	1994
533	<i>Pyrus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	B	P	1994
534	<i>Malus</i> sp.	Tallada d'Empordà	Baix Empordà	B	P	1994
535	<i>Prunus</i> sp.	L'Armenterà	Alt Empordà	Fl	M	1994
536	<i>Prunus</i> sp.	L'Armenterà	Alt Empordà	Fl	M	1994
538	<i>Pyrus communis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	B	C	1994
550	<i>Prunus amygdalus</i>	Calonge	Baix Empordà	B	C	1994
555	nd	nd	nd	nd	nd	nd
578	<i>Crataegus</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fl	M	1994
579	<i>Malus</i> sp.	Santa Cristina	Baix Empordà	Fl	C	1994
580	<i>Pyrus comunis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fl	C	1994
581	<i>Pyrus comunis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fl	C	1994
582	<i>Malus</i> sp.	Cassa de la Selva	Gironès	F	C	1994
583	<i>Crataegus</i>	Llagostera	Gironès	F	M	1994
584	<i>Pyrus comunis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fl	C	1994
585	<i>Pyrus comunis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	Fl	C	1994
586	nd	nd	nd	F	nd	1994
587	<i>Crataegus</i>	Llagostera	Gironès	Fl	M	1994
588	<i>Crataegus</i>	Llagostera	Gironès	Fl	M	1994
589	<i>Crataegus</i>	Llagostera	Gironès	Fl	M	1994
590	<i>Crataegus</i>	Llagostera	Gironès	F	M	1994
591	<i>Pyrus comunis</i>	Cassa de la Selva	Gironès	F	C	1994
597	<i>Crataegus</i>	Llagostera	La Selva	F	M	1994
598	<i>Crataegus</i>	Llagostera	La Selva	F	M	1994
599	<i>Crataegus</i>	Llagostera	La Selva	Fl	M	1994
601	<i>Prunus</i> sp.	La Tallada d'Empordà	Baix Empordà	F	C	1994
602	<i>Crataegus</i>	Llagostera	La Selva	F	M	1994

(*) Els aïllats del mateix hoste, i amb la mateixa procedència, procedeixen d'un total de tres o més mostres
 1, procedència en relació a : A, arrel; F, flulla; Fl, flor; B, borro
 2, procedència en relació a: C, camps cultivats, M, marges, B, bosc; P, plantacions comercials, H, hivernacle
 nd, no determinat

(*) Isolates from the same sample and the same location originated from three or more samples
 1, from: A, root; F, leaf; Fl, flower; B, buds
 2, from: C, crop field; M, border road, B, forest; P, commercial orchard, H; greenhouse
 nd, not determined

Annex 2**Medis de cultiu/Culture media****Agar A de King (King i col. 1954)**

Proteosa-Peptona (nº3)	20g
Agar	15g
Glicerol	10g
K ₂ SO ₄	10g
MgCl ₂	1.4g
H ₂ O destil·lada	1000 mL

pH 7.2 Autoclavar, 20 minuts a 121°C

Agar A de King modificat (KA(2))

Mateixa composició que el KA, canviant la Proteosa-Peptona (nº3) per Peptona bacteriològica.

Agar Luria Bertani (LB) (Maniatis i col. 1982)

Triptona	10 g
Na Cl	10 g
Extracte de llevat	5 g
Agar bacteriològic	15 g
H ₂ O destil·lada	1000 mL

Autoclavar, 20 minuts a 121°C

Agar B de King (KB) (King i col. 1954)

Proteasa-peptona (nº3)	15 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
glicerol	10 g
Agar bacteriològic	15 g
H ₂ O destil·lada	1000 mL

Autoclavar, 20 minuts a 121°C

KB líquid

Els mateixos components que l'agar B de King sense l'agar.

KMB⁺ (Simon i Ridge, 1974))

Els mateixos components que el KB líquid amb l'addició de cloranfenicol (13 µg/mL) i ampicilina (40 µg/mL).

Tampons/Buffers**AFT. Tampó fosfat salí**

NaCl	8 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.4 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.7 g

Disoldre en aigua destil·lada fins a 1000 mL. El pH ja queda a 7.2- 7.4.

Solució stock de Blocking: 10x ; Preparar una solució al 10 % p/v del reactiu de blocking amb tampó d'àcid maleic. La disolució és realitza amb continua agitació en una placa calefactora una hora a 60 °C. Autoclavar i emmagatzamar a 4 °C. La solució és opaca.

Solució de Blocking de treball: 1x, diluir la solució d'estoc 1:10 amb tampó d'àcid maleic.
10 % SDS

10 % p/v en aigua Milli-Q. Esterilitzar per filtració.

Solució de desnaturalització: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

Solució de neutralització: 1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 7.4 (21 °C), 0.1 % SDS. Filtrat

20x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Citrat-Na, pH 7

43.825 g NaCl

22.05 g Citrat sòdic

300 mL d'aigua, gotes NaOH (10N) ajustar a 250 mL

Tampó d'elució de DNA (EB). 10mM Tris HCL, pH 8

Tampó d'extracció 1. Tampó fosfat salí pH 7.2, amb 2 % de polyvinylpyrrolidone 10 (PVP-10), 1 % Manitol, 10 mM àcid ascòrbic i 10 mM de Glutation reduït.

Manitol 10 g

Àcid ascorbic 1.76 g

Glutation reduït 3 g

Polivinil pirrolidona (PVP-10) 20 g

Disoldre en aigua fisiològica tamponada (AFT). Ajustar el pH a 7 i esterilitzar per filtració.

Tampó d'extracció 2. 200 mM Tris HCl (pH-7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS, 2 % polyvinylpyrrolidone 10

Tampó de lisi 1

0.05M NaOH, 0.25 % SDS en aigua Milli-Q.

Tampó TAE (TAE 50x)

Tis base (Sigma, N5125) 121 g

Àcid acètic glacial 28.55 mL

EDTA 0.5 M pH8 50 mL

Disoldre en 350 mL d'aigua Milli-Q, ajustar el pH a 7.5-7.8 amb HCl concentrat i ajustar a 500 mL. Amb aigua Milli-Q

TAE 1X agafar 20 mL del tampó TAE 50x i enrasar a 1L amb aigua destilada.

Tampó de càrrega

En aigua Milli-Q, blau de bromofenol 0.25 %, Xilèn cianol FF 0.25 % i Glicerol 30 %.

Tampó d'àcid maleic : 0.1M àcid maleic, 0.15 M NaCl, ajustar a pH 7.5 (20 °C) amb NaOH sòlid i autoclavat

Tampó de rentat: Tampó d'àcid maleic autoclavat amb 0.3% Tween 20 (v/v). No autoclavar amb el Tween 20.

Tampó de detecció: 0.1M Tris-HCl, 0.1 M NaCl pH 9.5 (20 °C)

Proves / Tests

Prova de l'oxidasa: Emprant el reactiu tetrametil-p-fenildiamina en solució acuosa. S'humiteja eïun paper de filtre amb el reactiu, i s'hi deposita una nansa del cultiu. El color violeta mostra una reacció positiva.

Gram. Es va emprar com a alternativa la prova de la potassa dr Ryu (Ryu 1940). Es barreja una gota de KOH al 3% en aigua amb una nansa del cultiu. L'a solubilitat en KOH indica Gram negatiu i la insolubilitat, Gram positiu.

Tinció amb negre de Sudà. Preparar un frotis del cultiu de 48 h en YPGA. deixar secar. Pasar ràpidament per la flama la part inferior del portaobjectes fins que el frotis quedi fixat.

- Banyar el frotis fixat amb una solució del negre de Sudà al 0.3 % en etanol del 70 %. Incubar 10 min a temperatura ambient.
- Escórrer la solució de tinció. Rentar suaument amb aigua de l'aixeta durant uns moments. Eliminar l'aigua sobrant amb un mocador de paper.
- Summergir breument el frotis amb xilol. Secar amb un mocador de paper. (Treballar a la campana extractora)
- Rentar suaument a l'aixeta durant uns moments. Secar amb un mocador de paper. Tapar amb un cubreobjectes.
- Examinar la tinció amb un microscopi òptic a 1000 augments amb oli d'immersió.

Els grànuls de poli- β -hidroxibutirat es teneyeixen de negre-blau, mentre que les parets ho fan de color rosa.

<u>Material vari</u>	<u>Referència</u>	<u>Codi</u>
Agarosa	Ecogen Roche diagnostics,S.L.	AG100 7000007
Agitador orbital	Selecta	
Bromur d'etidi	Amresco	X328
Bosses per l'homogeneïtzador (Seward, Model 400)	LAB SYSTEM	
Campana de PCR Clean Bench	Sanyo	
Cambra Digital imaging systems AC120	Kodak	
Cubetes d'electroforesi. Minisub Cell GT	Bio Rad	
dNTPs	Pharmacia	27-2035-01
Eppendorfs de 1.5 mL de polipropilè	Quality Scientific Plastics	G509-GRD
Encebadors.	Roche Diagnostics, S.L.	
Enzims de restricció	Roche diagnostics, S.L	
Font d'electroforesi Power PAC300	Bio Rad	
Homogeneïtzador de pales. Masticador.	IUL Instruments	
Incubador	Sanyo	
Kit de neteja de bandes d'agarosa GenClean	Q·BIOgene	1001-200
Marcadors		
1Kb DNA ladder	Life Technology	15615-016
1 KB plus DNA ladder	Life Technology	10787-018
100 pb DNA ladder (LF)	Life Technology	15628-019
100 pb (MBI)	MBI Fermentas	SM0241
Lambda <i>EcoR I / Hind III</i>	MBI Fermentas	
Microcentrifuga 5415D	Eppendorff	
Microtubs de polipropilè de paret fina	Quality Scientific Plastics	430
Pipetes de desplaçament positiu	Gilson	
Taq polimerasa	Life technologies	10342-020
	Roche Diagnostics,S.L	85440928
	Cultex	M958013
Termocicladors:		
Minicycler™	MJ Research	
Personal cycler	Biometra	
Gene Amp ® PCR System 9700	PE Applied Biosystems	

<u>Material vari</u>	<u>Referència</u>	<u>Codi</u>
Transil-luminador FX-20M 1D Image Analysis Software	Vilvert Loumat Kodak	

Reactius/ Reactives

Solament se citen els reactius que no són emprats habitualment en un laboratori de microbiologia.

<u>Reactiu</u>	<u>Referència</u>	<u>Codi</u>
Àcid Maleic	Sigma	M0375
Agarose Gel DNA Extraction Kit	Roche diagnostics, S.L.	1696505
Citrat Sòdic	Merk	64480500
DIG Easy Hyb.	Roche Diagnostics, S.L.	1603558
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Roche Diagnostics, S.L.	1175041
EDTA	Sigma	E5134
Etanol absolut	Merk	9861000
Membranes de Nylon	Roche Diagnostics, S.L.	1699075
NaCl	Sigma	S3014
N-Lauril-sarcosina	Sigma	N5125
PCR DIG Probe Syntesis Kit 25R-20	Roche Diagnostics, S.L.	1636090

<u>Reactiu</u>	<u>Referència</u>	<u>Codi</u>
Proteïnasa K	Roche Diagnostics, S.L.	1373196
SDS	Fluka	71725
Tis-HCl	Sigma	N5125
Tween 20	Sigma	P2287

Annex 3

Medis de cultiu/Culture media (a més dels citats en l'annex 2). La preparació d'agar tou, es realitza amb la mateixa fórmula que el medi normal però amb una concentració d'agar de 4 g/L. En el cas del PDA, per preparar l'agar tou es va emprar el PDB afegint l'agar.

Agar Glucosa Asparagina

glucosa	20 g
L-asparagina	0.3 g
àcid nicotínic	0.05 g
K ₂ HPO ₄	11.5 g
KH ₂ PO ₄	4.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.12 g
agar	16 g
H ₂ O destil·lada	1000 mL

Autoclavar, 20 min a 121 °C

Agar patata dextrosa (PDA)

Potato-dextrose agar (DIFCO 0013-17-6)

Agar tomata

concentrat de tomata (Oro di parma)	10 g
CaCO ₃	2 g
H ₂ O destil·lada	1000 mL

Autoclavar, 20 min a 121 °C

Brou patata dextrosa (PDB)

Potato-dextrose broth (DIFCO 254920)

Brou nutritiu

Peptona	5 g
Extracte de carn	3 g
NaCl	5 g
H ₂ O destil·lada	1000 mL

Autoclavar, 20 min a 121 °C

Quitina col·loïdal (Rodriguez-Kabana i col. 1983, Frändberg i Schnürer 1998)

Preparar una solució de quitina col·loïdal segons Rodriguez-Kabana i col. 1983

- 1- Es barregen 4 g de Quitina amb 36 mL de HCl concentrat, es deixa en agitació durant 2 hores fins que es dissolgui, la dissolució presenta un color marronós.
- 2- A continuació s'aboca en un contenidor d' 1 L (una proveta és idònea) i s'enrasa a 1 L amb aigua de l'aixeta. Es deixa sedimentar durant tota una nit.
- 3- Se sifona el sobrenedant líquid i es torna a resuspendre la quitina amb aigua corrent, i es barreja per inversió.
- 4- Es repeteix 4 vegades més amb aigua de l'aixeta i 3 vegades en aigua desmineralitzada, en els transcurso de diferents dies i sempre que s'observin clarament les dos fases.
- 5- Abans de l'últim rentat, es barreja amb força i es passa per un sedàs de metall de 0.5 mm d'ull i el filtrat es guarda a en una ampolla a les fosques a 4 °C.
- 6- El contingut de quitina total es mesura posant mostres de 10 mL en vasos de porcelana prèviament pesats, incubant a 80 °C durant 24 h i tornen a pesar el vasos de porcel·lana .

Medi MM9(10x), és un derivat de M9 (Maniatis, 1982)

KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g
H ₂ O ultrapura	1000 mL

Varis

(Solament se citen els reactius que no són emprats normalment en un laboratori de microbiologia).

Bany criogènic	cb8-30E, Heto, Allerød. Dinamarca
Campana de seguretat biològica de Tipus II	Nuaire Classe II UN-426-400E-USA
Fitotron	Model PGR 15. Conviron. Canadà
Homogeneïtzador ultrasònic (Labsonic U2000)	B.Braun-Biotech S.A. Espanya
Incubadors	MLR 350 i 350H. Sanyo. Japó
Silica gel F ₂₅₄	Merk 105554
Quitina	Sigma C-7170
Vainilla	Sigma U-2375

Annex 4**Medis****Medi mínim 1 (Tweddell i col. 1994)**

Mg SO ₄ ·7 H ₂ O	0.2g
K ₂ HPO ₄	0.9g
KCl	0.2g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.002g
MnSO ₄	0.002g
ZnSO ₄	0.002g
H ₂ O destil·lada	1000 mL

Glucosa 100 mM

Medi mínim 2 (Lorito i col. 1993)

Mg SO ₄ ·7 H ₂ O	0.2g
K ₂ HPO ₄	0.87g
KH ₂ PO ₄	0.68g
KCl	0.2g
Cl ₂ Ca	0.002g
NH ₄ NO ₃	1g
H ₂ O destil·lada	1000 mL

Glucosa 100 mM i glicina 5 mM

Els reactius, productes i aparells emprats per la realització dels RFLP-PCR-rDNA o relacionats en general amb la PCR estan descrits a l'annex 2.

Tampons

Tampó de lisi (rDNA) 10 mM Tris HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 % p/v Tween 20

Tampó d'extracció peptonat 0.05 M Na₂HPO₄ i 0.02 M KH₂PO₄ i 0.1 % p/v de peptona)

Tampó fosfat 0.05 M Na₂HPO₄ i 0.01 M KH₂PO₄

Solucions i tampons per a l'electroforesi en camp polsant:**EC-lisi**

Tris HCl (1M)	3 mL
NaCl (5M)	100 mL
EDTA (0.5 M)	100 mL
H ₂ O MilliQ	250 mL

Ajustar a pH 7.5. Autoclavar a 120 °C durant 20 min i afegir:

Brij 58 (10 %)	25 mL
Deoxicolat (4 %)	25 mL
N-lauril sarcosina	2.5 g

en el moment d'emprar-la afegir 1 mg/mL de lisozim i 20 µg/mL de RNAasa.

ESP (+ proteïnasa K)

EDTA (0.5 M pH 9.5)	200 mL
N-lauril-sarcosina	2 g

Incubar unes 4 hores a 37 °C amb agitació fins la seva completa dissolució i afegir

Proteïna K 200 mg

Deixar incubar al voltant d'una hora a 37 °C amb agitació, repartir en alíquotes i conservar a -20 °C.

ESP (+ pronasa) Igual a l'anterior canviant la proteïna per pronasa.

PET IV

Tris HCl (1M) 10 mL
 NaCl (5M) 200 mL
 H₂O MilliQ fins a 1000 mL
 Ajustar a pH 7.6. Autoclavar a 120 °C durant 20 min.

TBE 5x modificat (baix contingut d'EDTA)

Tris base 121.1 g
 Àcid bòric 61.8 g
 EDTA 0.745 g
 H₂O MilliQ fins 2000 mL
 Disoldre i ajustar a pH 8. Autoclavar a 120 °C durant 20 min.

TE

Tris HCl (1M) 10 mL
 EDTA (0.5M) 0.2 mL
 H₂O MilliQ fins a 1000 mL
 Ajustar a pH 8. Autoclavar a 120 °C durant 20 min.

Marcadors (New England Biolabs. Maine. U.S.A.). En negreta es mostren les bandes que es resolen en les condicions d'electroforesi provades.

1- **Cromosomes de *Saccharomyces cerevisiae*** (Yeast chromosome PFGE marker). En les electroforesis realitzades en aquest treball es resolen com a màxim les 7 primeres bandes, ordenades en ordre creixent de mida (en Kb):

225/ 295/ 375/ 450/ 555/ 610/ 680/ 745/ 785/ 815/ 915/ 945/ 1100/ 1120/ 1640/ 1900

2- **Concatàmers del fag lambda** (Lambda ladder PFG marker). En les electroforesis realitzades en aquest treball es resolen com a màxim les 14 primeres bandes, ordenades en ordre creixent de mida (en Kb):

48.5/ 97/ 145.5/ 194/ 242.5/ 291/ 339.5/ 388/ 436.5/ 485/ 533.5/582/ 630.5/ 679/ 727.5/ 776/ 824.5/ 873/ 921.5/ 970/ 1018.5.

3- **Concatàmers del fag lambda i fragments de lambda digerit amb *HindIII*** (Low Ranger PFG Marker). En les electroforesis realitzades en aquest treball es resolen com a màxim unes 5 bandes, ordenades en ordre creixent de mida (en Kb):

0.13/ 0.56/ 2.03/ 2.32/ 4.36/ 6.55/ 9.42/ **23.1/ 48.5/ 97/ 145.5/ 194/** idem concatàmers de lambda.

Reactius i productes utilitzats en la PFGE:

Àcid bòric	Sigma Missouri, U.S.A.
Agaroses:	
Incert Agarose	FMC Bioproducts. Maine, U.S.A.
Sea-Kem ME Agarose	FMC Bioproducts. Maine, U.S.A.
Brij 58	Sigma Missouri, U.S.A.
Bromur d'etidi	Sigma Missouri, U.S.A.

Reactius i productes utilitzats en la PFGE:

BSA	New England Biolabs Massachusets. U.S.A..
CiNa	Panreac
Deoxicolat	Sigma Missouri, U.S.A.
EDTA	Roche Diagnostics, S.A Alemanya
Enzims de restricció	Roche Diagnostics, S.A. Alemanya
	New England Biolabs, Maine. USA.
	Merk. Alemanya
Etanol absolut	Sigma Missouri, U.S.A.
Lisozim	Sigma Missouri, U.S.A.
N-lauril-sarcosina	Roche Diagnostics, S.A Alemanya
Proteïnasa K	Roche Diagnostics, S.A. Alemanya
RNAasa	Roche Diagnostics, S.A. Alemanya
Tris HCl	Roche Diagnostics, S.A. Alemanya

Aparells

- Agitador orbital G33, New Brunswick, Edison, New Jersey, U.S.A.
- Analitzador d'imatges Gel 1000 Document de Biorad, Bio-rad Laboratories, U.S.A.
- Campana de flux laminar TELSTAR BV-30/70, Barcelona, Espanya.
- Centrífuga SORVAL RC 5C PLUS. DUPONT, Connecticut, U.S.A.
- Espectrofotòmetre Shimadzu Corporation UV-160A, Kyoto, Japan
- Font d'electroforesi EPS 500/400 de Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia.
- Homogeneïtzador de pales MASTICATOR. IUL Instruments.
- Incubador SANYO MR152. Electric Co. Ltd, Japan
- Refriterm HOT-COLD UL, Selecta, Barcelona, Espanya
- Sistema d'electroforesi Pulsaphor Plus 2015 i Gene Navigator de Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia.

Pàgines següents: Matrius de distàncies/ Next pages.: Distance matrixes

Continuació/Continuation

Distància genètica entre les soques emprades calculat amb el coeficient de Dice . Els valors de la part superior dreta corresponen als obtinguts amb l'enzim NdeII i els de la part inferior esquerra amb HaellI. Genetic distances between strains calculated with Dice coefficient. The values on the upper right are the genetic distances obtained by NdeII enzyme and the values on the lower right with HaellI.

Table with 27 columns (37-63) and 27 rows (64-90). The table contains numerical values representing genetic distances between various strains, with some cells containing '1' or other specific values. The table is organized into a grid with strain names listed on the left and top.

Distància genètica entre les soques productores de floroglucinol calculat amb el coeficient de Dice. Els valors de la part superior dreta corresponen als obtinguts amb els MRFLP-PFGE i els de la part inferior esquerra als RFLP-rDNA amb el conjunt dels 4 enzims.

Genetic distances between phloroglucinol producing strains calculated with Dice coefficient. The values on the upper right are the genetic distances obtained by MRFLP-PFGE and the values on the lower right with RFLP-rDNA with the 4 restriction enzymes.

ARDRA PFGE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1:O2-87																										
2:O4-87	1																									
3:CHA0		1																								
4:Pa15			1																							
5:ps31				1																						
6:WB1					1																					
7:WB52						1																				
8:JBR1-70							1																			
9:JWP12-84								1																		
10:EPS317									1																	
11:EPS807										1																
12:EPS808											1															
13:EPS809												1														
14:EPS810													1													
15:EPS811														1												
16:EPS812															1											
17:EPS813																1										
18:EPS814																	1									
19:EPS815																		1								
20:EPS816																			1							
21:EPS817																				1						
22:EPS818																					1					
23:EPS1019																						1				
24:EPS1024																							1			
25:EPS1025																								1		

Distància genètica entre una selecció de soques productores de floroglucinol calculat amb el coeficient de Dice en referència a l'anàlisi RFLP-*phlD* (matriu superior), i amb les dades conjuntes dels MRFLP-PFGE, RFLP-rDNA i RFLP-*phlD* (matriu inferior).

Genetic distances between phloroglucinol producing strains calculated with Dice coefficient in RFLP-*phlD* analysis (upper matrix), and combined MRFLP-PFGE, RFLP-rDNA i RFLP-*phlD* (lower matrix).

RFLP- <i>phlD</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1: Q2-87													
2: Q4-87	1												
3: CHA0	.372	.372											
4: Ps15	.578	.578	.341										
5: Ps31	.581	.581	.405	.682									
6: WB1	.366	.366	.725	.357	.425								
7: WB52	.366	.366	.725	.357	.425	1.000							
8: JBR1-70	.629	.629	.414	.659	.736	.410	.410						
9: JMP12-84	.733	.733	.386	.652	.705	.357	.357	.725					
10: EPS317	.329	.329	.366	.373	.366	.358	.358	.324	.373				
11: EPS807	.667	.667	.386	.609	.659	.405	.405	.725	.674	.373			
12: EPS808	.652	.652	.356	.681	.667	.372	.372	.710	.702	.364	.787		
13: EPS812	.727	.727	.442	.644	.674	.366	.366	.742	.756	.384	.711	.652	
14: EPS817	.681	.681	.382	.624	.652	.400	.400	.717	.688	.368	.968	.800	.703

PFGE/ARDRA/ RFLP- <i>phlD</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1: Q2-87													
2: Q4-87	1												
3: EPS812	.643	.643											
4: EPS807	.643	.643	.714										
4: EPS808	.643	.643	.714	1									
4: EPS817	.643	.643	.714	1	1								
7: JMP12-84	.759	.759	.828	.828	.828	.828							
8: JBR1-70	.690	.690	.897	.759	.759	.759	.933						
9: Ps15	.690	.690	.828	.690	.690	.690	.867	.867					
10: Ps31	.690	.690	.828	.828	.828	.828	.933	.867	.800				
11: CHA0	.222	.222	.296	.296	.296	.296	.214	.286	.214	.286			
12: WB1	.222	.222	.296	.296	.296	.296	.214	.286	.214	.286	1		
13: WB52	.222	.222	.296	.296	.296	.296	.214	.286	.214	.286	1	1	
14: EPS317	.174	.174	.174	.261	.261	.261	.250	.167	.167	.250	.273	.273	.273

	CHA0	EPS807	EPS812	EPS317	JB1-70	JMP12-4-WB1	Ps31	Q ₂₋₈₇	Ps15
CHA0									
EPS807	0,258								
EPS812	0,258	0,056							
EPS317	0,193	0,333	0,32						
JB1-70	0,24	0,056	0,017	0,314					
JMP12-4	0,243	0,047	0,038	0,321	0,038				
WB1	0,014	0,25	0,251	0,201	0,238	0,239			
Ps31	0,251	0,056	0,011	0,324	0,011	0,038	0,247		
Q ₂₋₈₇	0,267	0,138	0,129	0,321	0,125	0,123	0,262	0,134	
Ps15	0,258	0,044	0,044	0,317	0,043	0,027	0,255	0,043	0,129

Distancia genètica entre les seqüències del gen *phlD* calculat amb Kimura 2 paràmetres. Genomic distances between *phlD* sequences calculated with Kimura 2 parameters.

Q ₂₋₈₇	Q ₂₋₈₇	CM1A2	Q65c-80	Q8r1-96	EPS807	EPS812	PITR2	JB1-70	JMP12-4-M1-96	PILH1	F113	Ps31	Ps15	UP61	Pf5	WB1	CHA0	EPS317
CM1A2	0,133		0,015															
Q65c-80	0,134	0,008																
Q8r1-96	0,129	0,008	0,008															
EPS807	0,138	0,057	0,064	0,056														
EPS812	0,129	0,012	0,019	0,011	0,056													
PITR2	0,146	0,066	0,078	0,069	0,077	0,074												
JB1-70	0,125	0,014	0,017	0,009	0,056	0,017	0,066											
JMP12-4	0,123	0,038	0,046	0,038	0,047	0,038	0,073	0,038										
M1-96	0,131	0,054	0,063	0,056	0,057	0,056	0,08	0,056	0,039									
PILH1	0,146	0,066	0,078	0,069	0,077	0,074	0,003	0,066	0,073	0,079								
F113	0,127	0,043	0,049	0,041	0,042	0,043	0,064	0,041	0,036	0,049	0,064							
Ps31	0,134	0,008	0,014	0,006	0,056	0,011	0,066	0,011	0,038	0,056	0,066	0,041						
Ps15	0,129	0,041	0,049	0,043	0,044	0,044	0,068	0,043	0,027	0,028	0,031	0,043						
UP61	0,265	0,251	0,255	0,247	0,258	0,256	0,26	0,238	0,241	0,247	0,249	0,256						
Pf5	0,267	0,256	0,257	0,249	0,258	0,258	0,266	0,24	0,243	0,249	0,266	0,249	0,012					
WB1	0,262	0,249	0,251	0,242	0,25	0,251	0,257	0,238	0,239	0,244	0,257	0,247	0,012	0,012				
CHA0	0,267	0,256	0,257	0,249	0,258	0,258	0,266	0,24	0,243	0,249	0,266	0,249	0,251	0,003	0,014			
EPS317	0,321	0,322	0,324	0,317	0,333	0,32	0,331	0,314	0,321	0,317	0,331	0,322	0,324	0,199	0,193	0,201	0,193	

Annex 5**Instruccions del programa PROC CORRESP MCA.**

```

options pagesize=60;
Title dades ant;
data res;
infile "LOCALITZACIÓ DE LA TAULA QUE ES VOL EMPRAR" LRECL=2000
delimiter=";";
input soc$ hae taq nd rsi api phl pca prn quit iaa hcn apsg apsgf apsk
apskf apsl xkb xlb aeag aeagf aeak aeakf aeal asvg asvgf asvp asvl
apeg apegf apeg apel bcsv bcpe bcea pgma pggf;
if hae<3 then rhae='A';
if hae>3 and hae<=6 then rhae='B';
if hae>6 then rhae='C';
if taq<4 then rtaq='D';
if taq>4 and taq<=8 then rtaq='E';
if taq>8 then rtaq='F';
if nd<2 then rnd='7';
if nd>2 and nd<=4 then rnd='8';
if nd=>5 then rnd='9';
if rsi<5 then rrsi='G';
if rsi>5 then rrsi='H';
if api=1 then rapi='I';
if api=0 then rapi='J';
if phl=0 then rphl='/';
if phl=1 then rphl='*';
if pca=0 then rpca='\';
if pca=1 then rpca='!';
if prn=0 then rprn='&';
if prn=1 then rprn='%';
if quit=0 then rquit='^';
if quit=1 then rquit='{';
if iaa=0 then riaa='|';
if iaa=1 then riaa='°';
if hcn=0 then rhcn='?';
if hcn=1 then rhcn='@';
if apsg=0 then rapsg='a';
if apsg>0 then rapsg='b';
if apsgf=0 then rapsgf='c';
if apsgf>0 then rapsgf='d';
if apsk=0 then rapsk='e';
if apsk>0 then rapsk='f';
if apskf=0 then rapskf='g';
if apskf>0 then rapskf='h';
if apsl=0 then rapsl='i';
if apsl>0 then rapsl='j';
if xkb=0 then rxkb='k';
if xkb>0 then rxkb='l';
if xlb=0 then rxlb='m';
if xlb>0 then rxlb='n';
if aeag=0 then raeag='o';
if aeag>0 then raeag='p';
if aeagf=0 then raeagf='q';
if aeagf>0 then raeagf='r';
if aeak=0 then raeak='s';
if aeak>0 then raeak='t';
if aeakf=0 then raeakf='u';
if aeakf>0 then raeakf='v';
if aeal=0 then raeal='x';
if aeal>0 then raeal='y';

```

```

if asvg=0 then rasvg='z';
if asvg>0 then rasvg='w';
if asvgf=0 then rasvgf='ç';
if asvgf>0 then rasvgf='K';
if asvp=0 then rasvp='L';
if asvp>0 then rasvp='M';
if asvl=0 then rasvl='N';
if asvl>0 then rasvl='Ñ';
if apeg=0 then rapeg='Q';
if apeg>0 then rapeg='R';
if apegf=0 then rapegf='S';
if apegf>0 then rapegf='T';
if apep=0 then rapep='U';
if apep>0 then rapep='V';
if apel=0 then rapel='X';
if apel>0 then rapel='Y';
if bcsv>=0 and bcsv<=70 then rbcsv='1';
if bcsv>70 then rbcsv='2';
if bcpe>=0 and bcpe<=60 then rbcpe='3';
if bcpe>60 then rbcpe='4';
if bcea>=0 and bcea<=74 then rbcea='5';
if bcea>74 then rbcea='6';
if pgma>0 then rpgma='-';
if pgma=0 then rpgma='ç';
if pggf>0 then rpggf='Z';
if pggf=0 then rpggf='W';
proc print data=res;
run;
proc corresp mca dim=3 observed data=res outc=coor;
tables rhae rtaq rnd rrsi rapi rphl rpca rprn rquit riaa rhcn rapsg
rapsgf rapsk rapskf rapsl rxkb rxlb raeag raeagf raeak raeakf raeal
rasvg rasvgf rasvp rasvl rapeg rapegf rapep rapel rbcsv rbcpe rbcea
rpgma rpggf;
run;
data coor;
set coor;
y=dim1;
x=dim2;
text=_name_;
keep x y text;
run;
proc plot data=coor;
plot y * x=text / href=0 vref=0;
run;

```

Instruccions del programa CATMOD.

```

options pagesize=60;
Title dades ant;
data res;
infile "LOCALITZACIÓ DE LA TAULA QUE ES VOL EMPRAR" LRECL=2000
delimiter=";";
input soc$ phl pca prn quit iaa hcn ps xc ea sv pe bcsv bcpe bcea mar
gf;
if phl=0 then rphl='a';
if phl>0 then rphl='b';
if pca=0 then rpca='a';
if pca>0 then rpca='b';
if prn=0 then rprn='a';
if prn>0 then rprn='b';
if quit=0 then rquit='a';

```



```

if quit>0 then rquit='b';
if iaa=0 then riaa='a';
if iaa>0 then riaa='b';
if hcn=0 then rhcn='a';
if hcn>0 then rhcn='b';
if ps<=2 then rps='n';
if ps>2 then rps='s';
if xc<=0 then rxc='n';
if xc>0 then rxc='s';
if ea<=2 then rea='n';
if ea>2 then rea='s';
if sv<=1 then rsv='n';
if sv>1 then rsv='s';
if pe<=1 then rpe='n';
if pe>1 then rpe='s';
if rpe='n' and rsv='n' then AF='b';
if rpe='n' and rsv='s' then AF='a';
if rpe='s' and rsv='n' then AF='a';
if rpe='s' and rsv='s' then AF='a';
if rps='n' and rea='n' then ab='b';
if rps='n' and rea='s' then ab='a';
if rps='s' and rea='n' then ab='a';
if rps='s' and rea='s' then ab='a';
if rps='n' and rxc='n' then ab='b';
if rps='s' and rxc='n' then ab='a';
if rps='s' and rxc='s' then ab='a';
if rps='n' and rxc='s' then ab='a';
if rxc='n' and rea='n' then ab='b';
if rxc='n' and rea='s' then ab='a';
if rxc='s' and rea='n' then ab='a';
if rxc='s' and rea='s' then ab='a';
if bcsv<=70 then rbcsv='n';
if bcsv>70 then rbcsv='s';
if bcpe<=60 then rbcpe='n';
if bcpe>60 then rbcpe='s';
if bcea<=74 then bb='n';
if bcea>74 then bb='s';
if mar=2 then rmar='+';
if mar=1 then rmar='0';
if mar=0 then rmar='-';
if gf=2 then rgf='+';
if gf=1 then rgf='0';
if gf=0 then rgf='-';
proc print data=res;
var soc rphl rpca rprn rquit riaa rhcn AF ab bb rbcsv rbcpe rmar rgf;
run;
proc catmod;
model bb= rphl rpca rprn riaa rquit rhcn AF ab/freq oneway;
run;
proc catmod;
model rbcpe= rphl rpca rprn rquit rhcn AF ab/freq oneway;
run;
proc catmod;
model rbcsv= rphl rpca rprn riaa rhcn AF ab/freq oneway;
run;
proc catmod;
model rmar= rphl rhcn AF ab/freq oneway;
run;
proc catmod;
model rgf= rhcn AF ab/freq oneway;
run;

```