



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Detección y Cuantificación de *Trichoderma harzianum*, y Evaluación de su Actividad Biocontrol frente a la Fusariosis Vascular del Melón mediante la Aplicación de Herramientas Moleculares

Rubén López Mondéjar



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE



**Detección y Cuantificación de *Trichoderma harzianum*, y
Evaluación de su Actividad Biocontrol frente a la
Fusariosis Vascular del Melón mediante la Aplicación de
Herramientas Moleculares**



Rubén López Mondéjar

Tesis Doctoral

**Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada.
Universidad de Alicante.
Departamento de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos
Orgánicos. CEBAS-CSIC.**

**Alicante
Junio, 2011**



**Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada
Universidad de Alicante.**

**Departamento de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos
Orgánicos. CEBAS-CSIC.**

**Detección y Cuantificación de *Trichoderma harzianum*, y Evaluación de su
Actividad Biocontrol frente a la Fusariosis Vascular del Melón mediante la
Aplicación de Herramientas Moleculares**

Memoria de Tesis presentada por
Rubén López Mondéjar para optar al título de Doctor por la Universidad de Alicante.

**Directores de Tesis: Dr. José Antonio Pascual Valero y Dra. Margarita Ros
Muñoz.**

Programa de Doctorado: Biología Experimental y Aplicada.

Doctorando

VºBº de los Directores

Rubén López Mondéjar

Dr. José Antonio Pascual Dra. Margarita Ros

Alicante, Junio 2011

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), en el grupo de investigación "Enzimología y Biorremediación de Suelos y Residuos Orgánicos". Para la realización del presente trabajo el Ldo. Rubén López Mondéjar disfrutó de una Beca Predoctoral I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en o se encuentran en fase de revisión en revistas pertenecientes al Science Citation Index (SCI):

López-Mondéjar R, Anton A, Raidl S, Ros M, Pascual JA, **2010**. Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass. **Bioresource Technology 101, 2888-2891**.

Beaulieu R, **López-Mondéjar R**, Tittarelli F, Ros M, Pascual JA, **2011**. qRT-PCR quantification of the biological control agent *Trichoderma harzianum* in peat and compost-based growing media. **Bioresource Technology 102, 2793-2798**.

López-Mondéjar R, Beaulieu R, Ros M, Pascual JA, **2011**. SCAR-based real time PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions. En revisión.

López-Mondéjar R, Ros M, Pascual JA, **2011**. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. **Biological Control 56, 59-66**.

López-Mondéjar R, Blaya J, Ros M, Pascual JA, **2011**. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *in vitro* and greenhouse nursery experiments. En revisión.

Además, los resultados de esta Tesis se han incluido en comunicaciones a congresos:

R. López-Mondéjar, M. Ros, J.A. Pascual. Quantification by qRT-PCR of *Trichoderma harzianum*: a biological control agent against *Fusarium oxysporum*. IMC9 The Biology of Fungi, Edimburgo, Reino Unido, **2010**.

M. Ros, **R. López-Mondéjar**, J.A. Pascual. Selection of *Trichoderma harzianum* isolates with a high mycoparasitic potential against *Fusarium oxysporum*. IMC9 The Biology of Fungi, Edimburgo, Reino Unido, **2010**.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Agradecimientos

Antes de todo, me gustaría dedicar este espacio para darles las gracias a todas las personas que de un modo u otro han participado conmigo en la realización de esta Tesis Doctoral. Parece que fue ayer cuando llegué al CEBAS-CSIC para trabajar en control biológico, pero lo cierto es que, echando la vista atrás, han pasado varios años. Ésta ha sido una de las etapas más intensas de mi vida, durante la cual he conocido y trabajado con numerosas personas que me han ayudado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Han sido ellas las que han compartido conmigo tanto los buenos como los malos momentos, y es a ellas a las que quiero darles las gracias en estas breves líneas.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de Tesis, el Dr. José Antonio Pascual Valero, y la Dra. Margarita Ros Muñoz del CEBAS-CSIC. A Beni, agradecerte la oportunidad que me diste de trabajar en el fascinante mundo del control biológico, y de llevar a cabo la investigación molecular con *Trichoderma*. A Marga, agradecerte tus buenos consejos y sobre todo tu apoyo, especialmente durante los últimos años, sin el que estoy seguro no lo hubiera conseguido.

Quiero darle las gracias a continuación a todas las personas que forman o han formado parte del grupo de Control Biológico del Dr. Pascual del CEBAS-CSIC. Han sido muchos años y mucha gente, así que intentaré recordarlos a todos sin que se me escape ninguno:

Gracias a Tina y a Noelia, las pioneras, por enseñarme todo lo que sabíais del melón y de nuestros hongos *Trichoderma* y *Fusarium*. Nunca me olvidaré de nuestros días de verano en los semilleros y compostando, ni de nuestra vocación de manitas (con brocha en mano y máquina de gotelé) en la finca; al igual que siempre recordaré que hay que agitar las muestras veintidós veces, y que, a veces, las pérdidas de turba pueden ser "despreciables".

Muchas gracias también a la Dra. Anabel Antón, mi primera jefa, por iniciarme en el mundo de la biología molecular y las PCR, y por tus consejos y tu paciencia conmigo durante aquellos comienzos.

A Damián (er), por esas risas en el laboratorio (y fuera de él) en momentos muy estresantes, y por esas inolvidables tardes de compañía cortando coleoptilos de avena.

A todos los nuevos compañeros que llegasteis después al laboratorio, el "equipo G": Irma, Josef, Mara, María José, Yessiiii y Bárbara, por nuestras risas y buenos momentos en el laboratorio, en el "Chinatown" o "deshollinando" la finca.

Muchas gracias en especial al "grupo del té" de las sobremesas: María, Pepa y Eva. Gracias María por tu ayuda y paciencia preparando la quitina coloidal, y por estar dispuesta a ayudar en todo momento. A Pepa, muchas gracias por tus postres, tazas, pasta de dientes... y por esa "panoply" de bolsitas de té que nunca te faltan; mucho ánimo y mucha suerte con tu Tesis. Y a Evica (Evaaaaa), gracias por esos ratitos de charla en el laboratorio gracias a los cuales hemos conseguido sobrevivir y no perder la cabeza durante todos estos años; mucha suerte también con tu Tesis y "tus lodos".

También quiero darle las gracias a Robbie, por tu "increíble" ayuda en la realización de esta Tesis y tu amistad tanto dentro como fuera del laboratorio; y desearte mucha suerte con tus nuevos proyectos.

Muchas gracias también a Ainhoa, por esos viajecitos a Alicante adelantando camiones, en los que aprendimos muchísimo acerca de los "ratones mutantes".

Quiero darle las gracias también al grupo de Enzimología del Dpto. de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos del CEBAS-CSIC: Lola, Carmen, Eva, Nani, Sara y Keiji, y en especial gracias a Felipe, por tus consejos científicos y esas aventuras en Munich, y a César, por esas tardes en el laboratorio en las que hemos intentado arreglar el mundo. A los que estáis terminando mucho ánimo y mucha suerte con vuestras Tesis.

Gracias también a Ana, por tu amistad desde el primer día y sobre todo en aquellos momentos en los que nos quedamos "solitos" en el CEBAS, y gracias por tu ayuda y alegría siempre. No cambies nunca.

Muchas gracias también a todos los compañeros del CEBAS (no sólo de la cuarta planta) que me han acompañado todos estos años, y con los que hemos

logrado romper las “barreras de planta” y pasar muy buenos momentos tanto en el comedor como fuera del CEBAS. Gracias a Jesús, Elena, María José, Ana, Carmencita, Encarni, Nuria, Isa, y tantos otros.

Gracias también en especial al Dr. Fabio Tittarelli del CRA-RPS, por tus buenos consejos y por tu simpatía y buen humor, que siempre consigues transmitir a todos en el laboratorio.

Me gustaría aprovechar estas líneas también para mostrar mi agradecimiento al Dr. Luis Vicente López-LLorca y al Dr. Jesús Salinas, del Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada de la Universidad de Alicante, por su ayuda como tutores durante los estudios del doctorado y la realización del DEA y de esta Tesis.

Muchas gracias también a los revisores externos de esta Tesis para poder obtener el Doctorado Europeo, por la prisa que se han dado para leérsela a pesar de lo liados que estaban.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral he tenido la suerte de poder realizar estancias en Alemania y Austria, lo cual me ha aportado no sólo conocimientos científicos, sino también muy buenas experiencias personales:

I would like to thank Dr. Stefan Raidl and Prof. Dr. Reinhard Agerer for accepting me as a member of their lab, and the LMU Department für Biologie Systematische Botanik und Mykologie in Munich, especially to Erika, Sebastian and Norou, for your friendship in the lab. También agradecer su ayuda tanto a Mónica como a Rubén, por su amistad, sus consejos y su apoyo durante mi estancia en Munich. No se que hubiera hecho sin vosotros aquel lluvioso verano y mis nulos conocimientos de la cultura bávara. Gracias a vosotros conseguí superar aquel reto.

I would also like to thank Dra. Verena Seidl and Prof. Dr. Christian Kubicek for accepting me as a member of their lab, and the whole Gene Technology and Applied Biochemistry division of the Institute of Chemical Engineering of TU in Vienna. I would like to thank especially to the “foreign group”: Tao, Vale, Karol, and Liliana, for your friendship in the lab, and also to my lab mates Sabine and Simone. Muchas gracias

también a toda la colonia española Erasmus en Viena, por esas noches en el LocoBar, y esos viajes por Centroeuropa. Muchas gracias en especial a Sara, Victoria y Ana Cacho, por esas risas y esas cenitas en los momentos difíciles. Y muchas gracias especialmente a Ana y a Ioannis, por vuestro apoyo y amistad durante aquel verano y aquel otoño. Siempre recordaré nuestro “fantástico” crucero por el Danubio y nuestros debates sobre la cultura austriaca. Mucho ánimo también con vuestros proyectos.

Y volviendo a España, me gustaría darles las gracias también a todos mis amigos, que durante todos estos años de Tesis han compartido conmigo frustraciones y alegrías. Muchas gracias al “lado claro”: Cristi, Tere y Hele, por esos viajecitos para desconectar por España (y por donde sea que nos den casa); y muchas gracias también al “lado oscuro”: Lore, Damián, y Bea, por vuestras visiticas durante mi estancia en Munich. Gracias también a Miriam, Adri, Encarni, Carmen, Inma, y en especial a Andrés, por ser esa “fuente de antibióticos”, y a Estefanía, por esas clonaciones “de extranjs”.

Y por último y más importante darle las gracias a mi familia. A mis padres, Antonio y Consuelo, por estar ahí y apoyarme durante todos estos años, desde el comienzo de la carrera hasta hoy, y por aguantar mis malos ratos y mal humor algunas veces a causa de esta Tesis. Y agradecer también a mis hermanas, Leticia y Loida su apoyo. Muchas gracias Leti por aconsejarme gracias a tu experiencia, y darme ánimos en los últimos momentos. Y Lodi, gracias también por tus “profundas expresiones de ánimo”, que tanto animan.

Antes de terminar, me gustaría extender mi agradecimiento a todas aquellas personas que, seguramente por descuido, he olvidado citar, pero que también han estado ahí durante el desarrollo de esta Tesis y participado de ella, y que junto a los anteriores me han permitido el poder decir, finalmente, ¡lo he conseguido!

¡Muchas gracias a todos!



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

A mis padres

Índice

I. Introducción	1
1. Cultivo del melón y fusariosis vascular	3
1.1. Características generales del cultivo del melón	3
1.2. Fusariosis vascular del melón	5
2. Control biológico de enfermedades de plantas.....	7
2.1. Agentes de control biológico (ACBs).....	8
2.2. Prácticas culturales en control biológico	9
3. Control biológico y cultivo ecológico en semillero.....	10
4. <i>Trichoderma harzianum</i> en el control biológico de fitopatógenos	12
4.1. Características generales de <i>Trichoderma</i> sp.....	12
4.2. Principales mecanismos de acción de <i>T. harzianum</i>	15
4.2.1. Mecanismos directos.....	16
4.2.2. Mecanismos indirectos	17
5. La importancia del micoparasitismo de <i>T. harzianum</i> en el control biológico	18
6. Métodos de detección y cuantificación de hongos	19
6.1. Metodología clásica	20
6.2. Métodos moleculares	22
7. Usos de la PCR a tiempo real en el estudio del control biológico de enfermedades.....	24
7.1. Fundamentos y metodologías de la PCR a tiempo real.....	24
7.2. Monitorización de hongos antagonistas y fitopatógenos.....	28
7.3. Estudio y expresión de genes de interés en biocontrol	30
II. Interés del trabajo y objetivos	33

III. Capítulo primero: “Quantification of the biocontrol agent <i>Trichoderma harzianum</i> with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass”	37
Resumen.....	39
Artículo.....	41
IV. Capítulo segundo: “qRT-PCR quantification of the biological control agent <i>Trichoderma harzianum</i> in peat and compost-based growing media”	47
Resumen.....	49
Artículo.....	51
V. Capítulo tercero: “SCAR-based real-time PCR for early detection of <i>Fusarium oxysporum</i> in melon seedlings under greenhouse nursery conditions”	59
Resumen.....	61
Artículo.....	61
VI. Capítulo cuarto: “Mycoparasitism-related genes expression of <i>Trichoderma harzianum</i> isolates to evaluate their efficacy as biological control agent”	71
Resumen.....	73
Artículo.....	73
VII. Capítulo quinto: “Evaluation of the effect of chitin-rich residues on chitinolytic activity of <i>Trichoderma harzianum</i>: <i>in vitro</i> and greenhouse nursery experiments”	87
Resumen.....	89
Artículo.....	91
VIII. Discusión general	101
IX. Conclusiones	113
X. Resumen	117
XI. Summary	123
XII. Bibliografía	129



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

I. Introducció

1. Cultivo del melón y fusariosis vascular

1.1. Características generales del cultivo del melón

El melón, *Cucumis melo* L., es una planta de la familia Cucurbitaceae que se ha cultivado desde antiguo en climas cálidos de todo el mundo. Según datos de la FAO, en el año 2009 se dedicaron a este cultivo más de 1,2 millones de hectáreas en todo el mundo, con una producción mundial de más de 27 millones de toneladas. España es el principal productor de Europa, por encima de países como Italia, Ucrania, Francia y Grecia, dedicando a este cultivo más de 31.400 hectáreas, con una producción anual de 1.005.800 toneladas (FAOSTAT, 2011).

Las semillas de melón germinan y crecen en semillero hasta su transplante definitivo a campo, para asegurar de esta manera una mayor supervivencia y evitar posibles mermas en campo debido a la existencia de plagas y enfermedades. En el semillero, las semillas se germinan en sustratos orgánicos, generalmente turba, en bandejas de poliestireno divididas en alvéolos (Foto 1). En el caso del melón, el tiempo de residencia en semillero es de unos 35-40 días, dependiendo de la variedad de melón, el tipo de sustrato empleado o de las condiciones ambientales.



Foto 1. Imágenes de bandejas de poliestireno con plántulas de melón en el semillero.

Durante esta etapa del desarrollo, las plántulas de melón son vulnerables al ataque de diferentes plagas y patógenos, que reducen generalmente el crecimiento de la plántula, haciendo inviable el cultivo para su transplante en campo en la

Introducción

mayoría de los casos. Algunas de estas plagas y enfermedades se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Plagas y enfermedades más comunes que pueden atacar a las plántulas de melón en semillero.

Plagas	Agente causal
Araña roja	<i>Tetranychus</i> sp.
Mosca blanca	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> , <i>Bemisia tabaci</i>
Pulgón	<i>Aphis gossypii</i> , <i>Myzus persicae</i>
Minadores	<i>Liriomyza huidobrensis</i> , <i>L. trifolii</i>
Nematodos	<i>Meloidogyne</i> sp.
Enfermedades víricas	
CMV	Virus del mosaico del pepino
ZYMV	Virus del mosaico amarillo del calabacín
MNSV	Virus del cribado del melón
Enfermedades bacterianas	
Manchas angulares	<i>Pseudomonas syringae</i>
Manchas bacterianas	<i>Xanthomonas campestris</i>
Podredumbre blanca	<i>Erwinia carotorova</i>
Enfermedades fúngicas	
Oidio	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>
Mildiu	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> , <i>Erysiphe cichoracearum</i>
Podredumbre radicular	<i>Olpidium radicale</i>
Chancro gomoso del tallo	<i>Didymella bryoniae</i>
Marchitez foliar	<i>Alternaria cucumerina</i>
Podredumbre de carbón	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Podredumbre del hipocótilo	<i>Acremonium</i> sp.
Fusariosis vascular	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>

1.2. Fusariosis vascular del melón

La fusariosis vascular es una de las enfermedades más graves que afectan al cultivo del melón, causando enormes pérdidas a nivel mundial (Kim y col., 1993; Martyn y Gordon, 1996). Esta enfermedad se describió por primera vez en España en 1979 (Maroto, 1994), y está causada por el hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend Fr. *forma specialis melonis* W.C. Snyder & H. N. Hans (FOM) (Foto 2A). Este hongo mitospórico (anamorfo) posee su teleomorfo en el género *Gibberella*, de la familia Nectriaceae, el orden Hypocreales, la clase Sordariomycetes pertenecientes a la división Ascomycota (Index Fungorum, 2008). La mayoría de hongos agrupados en la especie *F. oxysporum* se caracterizan por invadir los vasos del xilema de la planta, obstruyendo el paso de agua y nutrientes, y provocando la necrosis de los haces vasculares. Esta interrupción del transporte provoca la marchitez de las hojas y finalmente la muerte de la planta (Agrios, 2005). Dentro de esta especie se han definido más de 150 *formae speciales*, en base del hospedador al que infecten (Baayen, 2000).

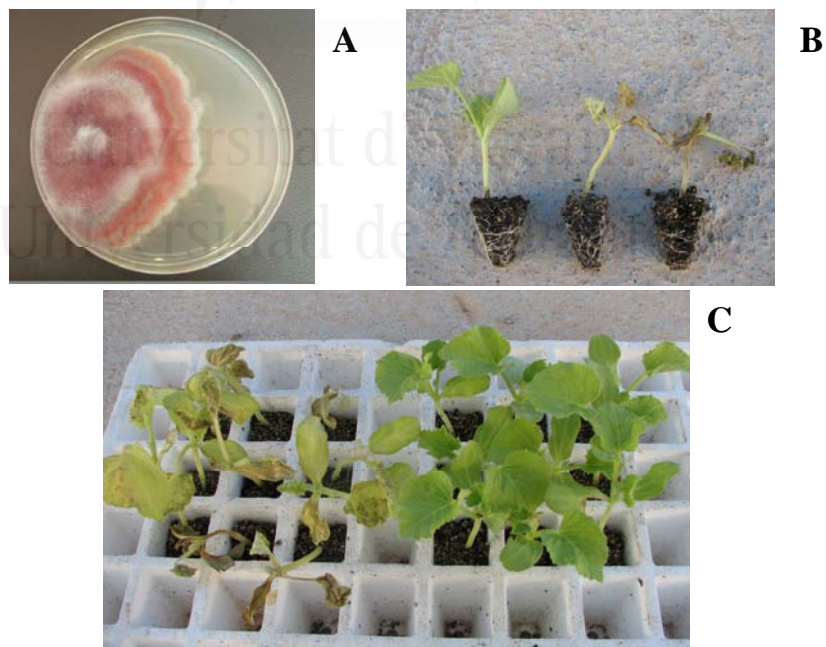


Foto 2. Detalles de la fusariosis vascular. A) *F. oxysporum* creciendo en medio de cultivo; B) y C) marchitamiento producido por este hongo en plántulas de melón (amarillamiento, disminución del crecimiento y necrosis) frente a plantas sanas (verdes).

Las plantas infectadas por este hongo en las primeras fases de crecimiento generalmente se marchitan y mueren tras aparecer los primeros síntomas (Foto 2B y C). Cuando el patógeno infecta la planta en un estado más tardío, los síntomas vienen marcados por una disminución del crecimiento, un amarillamiento de las hojas jóvenes, y la aparición de zonas necróticas en el tallo, hasta que finalmente la planta muere (Blancard y col., 1991). La enfermedad puede causar verdaderos desastres en cultivos de melón, llegándose en algunos casos a pérdidas de más del 90% de la cosecha (Soriano-Martín y col., 2006).

Las condiciones de humedad y temperatura de los semilleros son óptimas para la infección de *F. oxysporum* (Gómez y Tello, 2000a), produciéndose muchas veces las infecciones en este nivel del cultivo, lo que provoca enormes pérdidas.

Además, las esporas de este hongo presentan una gran facilidad de dispersión, ya sea a través del agua de riego y salpicaduras, de semillas infectadas, del aire, o del uso de maquinaria y material contaminado. Así, por ejemplo, uno de los mejores modos para evitar la aparición y desarrollo de esta enfermedad es la eliminación de posibles restos del hongo que hayan podido quedar tras el cultivo en semillero. Muchas veces esto no es posible, ya que en los semilleros se suelen reutilizar las bandejas empleadas para la germinación de las semillas. En el peor de los casos, cuando los síntomas de la enfermedad no son visibles en el semillero y las plantas se trasplantan al campo, se produce un agravamiento del problema al producirse la dispersión del patógeno (Blancard y col., 1991). Esto provoca un aumento en los niveles de inóculo en esas áreas favoreciendo que la enfermedad persista en el tiempo convirtiéndose en endémica. En efecto, las esporas de resistencia (clamidosporas) de *F. oxysporum* pueden permanecer en el sustrato o los materiales infectados durante años, siendo muy difícil la eliminación de este patógeno (Suárez-Estrella y col., 2003; Zhang y col, 2005).

El control de la fusariosis vascular mediante medios químicos no es sencillo. Entre los fungicidas que se han empleado para el control de esta enfermedad, durante el cultivo, destaca etridiazol 48% (cuya retirada de uso en la UE está prevista para el 31 de diciembre de 2011) y procloraz 45% (compuesto tóxico para aves,

mamíferos y organismos acuáticos). Otros medios de prevención consisten en la desinfección de los materiales de partida, destacando la higienización de bandejas mediante hipoclorito de sodio. Estos agentes no son totalmente efectivos, causando además serios problemas de toxicidad en plantas jóvenes, y conllevando riesgos para los empleados y el medio ambiente (Soriano-Martín y col., 2006). Otros productos químicos como el bromuro de metilo también se han utilizado para eliminar las esporas de *F. oxysporum*. Sin embargo el protocolo de Montreal estableció su retirada progresiva comenzando en el año 2005 hasta el 2015 (Ricárdez-Salinas y col., 2010), debido a los graves riesgos que presenta para la salud humana y para el medio ambiente, estando relacionado su uso con la destrucción de la capa de ozono.

No existen por ello medios químicos eficaces ni medioambientalmente sostenibles para la eliminación del hongo patógeno vascular. Por ello, es fundamental la búsqueda de métodos de detección y control del agente fitopatógeno (Suárez-Estrella y col., 2007), que permitan la localización de las plantas infectadas en los primeros estadios del cultivo, y que ayuden a reducir la incidencia de la enfermedad y las pérdidas asociadas a la misma.

2. Control biológico de enfermedades de plantas

En contraposición al control químico, caracterizado por el empleo de productos químicos en agricultura, ha surgido el concepto de control biológico. El **control biológico** o **biocontrol** fue definido por Cook y Baker (1983) como “la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad de un patógeno para producir una enfermedad por o a través de uno o más organismos distintos al hombre”. Así, dentro del control biológico se encuentran el uso de variedades del patógeno menos virulentas o avirulentas, el empleo de cultivariedades más resistentes del hospedador, y el uso de microorganismos antagonistas, denominados agentes de control biológico (ACBs), así como también la rotación de cultivos y la adición de abonos de origen animal y vegetal.

El empleo de estas prácticas de control biológico reduce la necesidad de utilizar tanto fertilizantes como fungicidas químicos, disminuyendo los problemas

ambientales que conllevan estos productos, así como el desarrollo de resistencias a determinados patógenos por el repetido uso de estas sustancias, y la eliminación de microorganismos beneficiosos del suelo, como las micorrizas y los hongos antagonistas, tras la aplicación de fungicidas de amplio espectro.

2.1. Agentes de control biológico (ACBs)

Los microorganismos antagonistas, también llamados agentes de control biológico (ACBs), suelen encontrarse de forma natural en el suelo, y conllevan efectos beneficiosos para los cultivos. Sin embargo, el uso intensivo de los suelos agrícolas suele provocar un descenso en las poblaciones de los mismos, disminuyéndose por tanto su efecto beneficioso para los cultivos. Entre los microorganismos antagonistas del suelo encontramos aislados de géneros de hongos tales como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Gliocladium*, así como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Suárez-Estrella y col., 2007). Estos microorganismos interactúan con los patógenos de plantas de diferentes modos: compitiendo por los nutrientes, generando metabolitos secundarios con efecto antibiótico o parasitando directamente a los organismos fitopatógenos. Además, mejoran el crecimiento de las plantas y generan resistencia inducida en éstas frente a situaciones de estrés (Alabouvette y col., 2006). Estos efectos beneficiosos justifican su uso como alternativas reales a los fungicidas químicos.

Una de las principales críticas del uso de ACBs es su falta de consistencia en el control de enfermedades. Sin embargo, esta falta de consistencia está más relacionada con fallos en los modos de aplicación que en la falta de acción propiamente dicha. Es importante conocer y estudiar qué tipo de inóculo es el adecuado, así como cuales son las mejores condiciones para su inoculación, tales como tasa o tiempo de aplicación (Montesinos y col., 2008). También es necesario monitorizar el desarrollo del ACB una vez aplicado en un cultivo, así como realizar una selección de ACBs con un elevado efecto supresor frente a un determinado patógeno. Todo ello puede mejorar enormemente los resultados obtenidos en resistencia a la enfermedad. A su vez, como han apuntado autores como Hjeljord y

Trosno (1998), es importante definir qué se quiere conseguir con el control biológico. Aunque a simple vista la reducción de la enfermedad en un cultivo sea lo más importante, los agentes de control biológico ayudan a reducir las enfermedades en futuros cultivos en esa zona, ya que los microorganismos inoculados pueden sobrevivir en el suelo, a diferencia de los productos químicos, que deben aplicarse de nuevo cada temporada de cultivo.

2.2. Prácticas culturales en control biológico

Como complemento a la aplicación de ACBs, existen también diferentes prácticas culturales que ayudan a controlar la enfermedad y también se incluyen en el control biológico. Éstas se basan principalmente en métodos profilácticos, que evitan la aparición de la enfermedad en el cultivo, evitando la introducción del patógeno y su posible desarrollo en un área determinada. Estos métodos profilácticos incluyen el empleo de semillas y material no contaminado, la eliminación de residuos procedentes de cultivos anteriores, y otras prácticas como la solarización y/o biosolarización (solarización-biofumigación) de los suelos (Tamiatti y Valentino, 2006).

El empleo de compost como enmiendas orgánicas es otra de las estrategias empleadas para favorecer el control biológico de fitopatógenos (Alabouvette y col., 2006). Los compost se definen como el producto obtenido de la descomposición de materia orgánica bajo condiciones controladas de humedad, temperatura y aireación. Los compost se han utilizado como enmiendas orgánicas del suelo porque se encuentran libres de patógenos, y son agrónomicamente ventajosos y relativamente baratos (Ros y col., 2005). Su composición puede ser muy heterogénea, desde lodos de aguas residuales, a residuos sólidos urbanos así como de la industria agroalimentaria, pasando por residuos de plantas o estiércol animal (Yogev y col., 2006). Entre sus principales ventajas se incluyen su alto contenido en nutrientes y materia orgánica. Además, los microorganismos que contienen los compost pueden producir un efecto supresor contra numerosas enfermedades vegetales producidas por los hongos del suelo.

Otras prácticas culturales incluyen el empleo de productos naturales como la quitina y sus derivados, extractos de algas o de plantas, etc. Estos compuestos no sólo contribuyen a mejorar el cultivo debido a su aporte de nutrientes y de materia orgánica, sino que también pueden poseer propiedades antimicrobianas. Por dichas características, los productos naturales se han empleado en el control biológico de enfermedades (Alabouvette y col., 2006). Además, la aplicación de estos productos en combinación con determinados ACBs podría mejorar enormemente el efecto de control biológico frente a algunos fitopatógenos.

3. Control biológico y cultivo ecológico en semillero

La producción de plantas en los semilleros sin emplear productos químicos es muy reducida. Las principales limitaciones de esta baja producción se deben al riesgo de enfermedades que pueden limitar el rendimiento de la producción, junto a la aún poca superficie dedicada por los países para la **agricultura ecológica**, también llamada **orgánica** o **biológica** (Lammerts van Bueren y col., 2003).

Esta situación, sin embargo, ha ido cambiando durante los últimos años. A la mayor concienciación de una parte de la sociedad de desarrollar actividades sostenibles con el medio ambiente, debemos añadir la nueva regulación de la Unión Europea, enfocada en la reducción del empleo de productos químicos potencialmente peligrosos para el ser humano y la naturaleza. Ambas situaciones han llevado a una mayor demanda de productos biológicos y al consiguiente aumento de la superficie destinada al cultivo ecológico. Así, en el año 2009, se dedicaron a agricultura ecológica en España más de 1,6 millones de Ha. Esta cifra sitúa a España como la primera productora de agricultura ecológica a nivel europeo, y como una de las mayores a nivel mundial por detrás de Australia, Argentina, Estados Unidos, China y Brasil (MAPA, 2010). Todo esto ha generado la necesidad de aumentar la producción de plántulas ecológicas en semillero.

El control de enfermedades de forma biológica en el semillero no es una tarea sencilla. Ello es debido, por un lado, a la elevada sensibilidad de las plántulas en esta

etapa del cultivo, junto a la imposibilidad de utilizar fungicidas de síntesis química (Lammerts van Bueren y col., 2010).

La utilización de medidas profilácticas que eviten la dispersión del patógeno en el semillero o la utilización de compost como sustrato de cultivo de las plántulas, están entre los métodos más efectivos. Esto se debe principalmente a la capacidad supresora o de control biológico que presentan algunos compost, en contraposición a las turbas usadas tradicionalmente en semillero, que son especialmente conductivas a muchos patógenos (Yogev y col., 2006). Algunas de las diferentes enfermedades controladas por los compost como sustratos incluyen el colapso de las plántulas y las podredumbres de la raíz, causadas por hongos tales como *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, y *Phytophthora sp.*, así como las marchitamientos vasculares causados por *F. oxysporum* y *Verticillium dahliae*. Este carácter supresivo es debido principalmente a la composición microbiológica del compost. Durante el proceso de compostaje, el aumento de temperatura en la fase termófila produce un “vacío biológico”, permitiendo la posterior recolonización de numerosos microorganismos, muchos de los cuales son ACBs, de forma natural. Sin embargo, cuando esta colonización natural no ocurre, el compost puede ser inoculado artificialmente con ACBs, mejorando la capacidad de control biológico del mismo (De Ceuster y Hoitink, 1999). Así, la inoculación de aislados del hongo *Trichoderma* en compost se ha mostrado efectiva para controlar enfermedades producidas por patógenos fúngicos como *Cloanephora cucurbitarum* (Siddiqui y col., 2008), *Rhizoctonia solani* (Trillas y col., 2006) *Sclerotinia cepivorum* (Coventry y col., 2006), *Botrytis cinerea* (Horst y col., 2005), *Phytophthora sp.* (Khan y col., 2004) y *F. oxysporum* (Cotxarrera y col., 2002; Sant y col., 2010) en semillero.

Además, el empleo de compost mejora el crecimiento de la planta, debido a su aporte nutritivo y a la posible presencia de compuestos similares a hormonas que actúan como promotores del crecimiento (Bernal-Vicente y col., 2008). A su vez, el aporte de materia orgánica fomenta la retención de agua, favoreciendo la reducción del riego (Singer y col., 2006).

Estas características hacen de los compost buenas alternativas al uso de turbas tradicionales en semilleros. En este sentido, se está reconsiderando últimamente el uso de turbas, debido a factores tanto económicos (el elevado precio de la turba) como medioambientales (las turberas son un recurso no renovable cuya explotación no es sostenible) (Tittarelli y col., 2009). Este planteamiento de sustitución de turbas por compost depende del tipo de compost empleado (que presente unas características físicas y una conductividad eléctrica similares a las de la turba). En otros casos, el compost puede mezclarse en diferentes proporciones con la turba, para conseguir un sustrato apto para el desarrollo de las plantas (Tittarelli y col., 2009). Además, el empleo de compost contribuye al reciclaje de residuos orgánicos (Hoitink y col., 1997; Alabouvette y col., 2006).

4. *Trichoderma harzianum* en el control biológico de fitopatógenos

4.1. Características generales de *Trichoderma* sp.

Los aislados del género *Trichoderma* se encuentran entre los agentes de control biológico más utilizados en agricultura, ya que actúan eficazmente contra numerosos hongos fitopatógenos presentes en el suelo (Chet, 1987). Las especies con mayor efecto en control biológico incluyen *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. asperellum* y *T. harzianum*. Estas especies se caracterizan por presentar un rápido crecimiento, poseer una gran capacidad de esporulación y de adaptación a un amplio rango de suelos agrícolas. Los aislados de *Trichoderma* son sensibles a diferentes condiciones abióticas medioambientales como temperatura, humedad y nutrientes, si bien su gran adaptabilidad les permite sobrevivir en gran cantidad de hábitats (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Estos hongos compiten bien en la rizosfera de la planta, como endófitos, siendo capaces de colonizar completamente la superficie radicular. Además, penetran en el tejido de la raíz, normalmente hasta la primera o segunda capa de células, y sólo en los espacios intercelulares (Brotman y col., 2010). Todas estas características hacen de este hongo uno de los principales ACBs utilizados en agricultura (Tabla 2). Cerca del 50% de los ACBs fúngicos del mercado pertenecen al género *Trichoderma* (Whipps y Lumsden, 2001).

Tabla 2. Especies del género *Trichoderma* empleadas en el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas en diferentes cultivos.

Especie	Antagonista frente a	Cultivo
<i>T. atroviride</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Patata (Lahlali y Hijri, 2010)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Fresa (Faize y col., 2003)
	<i>Sclerotinia sclerotium</i>	Alfalfa (Li y col., 2005).
	<i>Armillaria mellea</i>	Uva (Savazzini y col., 2008).
<i>T. asperellum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomate (Cotxarrera y col., 2002; Segarra y col., 2010).
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Pepino (Yedidia y col., 2003).
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pepino (Trillas y col., 2006).
	<i>Pythium</i> sp.	Tomate (Aerts y col., 2002)
<i>T. hamatum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Rábano (Heremans y col., 2005).
	<i>Sclerotinia minor</i>	Lechuga (Rabeendran y col., 2006).
	<i>Botrytis cinerea</i>	Begonia (Horst y col., 2005).
	<i>Xanthomonas vesicaria</i>	Tomate (Alfano y col., 2007).
<i>T. harzianum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Pepino (Elad, 2000), tomate (Fiume y Fiume, 2006)
	<i>Sclerotinia sclerotium</i>	Pepino (Elad, 2000), soja (Menéndez y Godeas, 1998)
	<i>Pseuoperonospora cubensis</i>	Pepino (Elad, 2000)
	<i>Sphaeroteca fusca</i>	Pepino (Elad, 2000)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Abeto de Douglas (Mousseaux y col., 1998), melón (López-Mondéjar y col., 2010), vid (El-Mohamedy y col., 2010)
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Tomate (Strashnov y col., 1985; Amer y Abou-El-Seoud, 2008), rábano (Lee y col., 2008).
	<i>Pythium</i> sp.	Maiz (Harman y col., 2004), tomate (Aerts y col., 2002).
	<i>Bipolaris oryzae</i>	Arroz (Abdel-Fattah y col., 2007)
	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Vid (Di Marco y Osti, 2007)

Introducción

Las especies del género *Trichoderma* se clasifican dentro de la familia Hypocraceae, en el orden Hypocreales, y en la clase Sordariomycetes de la división Ascomycota (Index Fungorum, 2008). Morfológicamente se distinguen alrededor de 30 especies del género *Trichoderma*. Sin embargo, la introducción de los métodos moleculares en micología evolutiva en los últimos años ha revelado la existencia de más de 100 especies distintas (Druzhinina y col., 2006).

Una de las más frecuentes en la mayoría de ambientes es *T. harzianum*. Además, esta especie es una de las principales utilizadas como ACB, siendo en muchos casos su nombre sinónimo de control biológico (Foto 3). Las especies de *Trichoderma* son la fase anamórfica de especies del género teleomórfico *Hypocrea*. Así, por ejemplo, se ha relacionado la especie *T. atroviride* con *H. atroviridis* (Dodd y col., 2003), *T. virens* con *H. virens* (Chaverri y col., 2001) o *T. ressei* con *H. jecorina* (Kuhls y col., 1996).



Foto 3. Diferentes aislados de *T. harzianum* (de color verde) creciendo en placa frente al patógeno *F. oxysporum* (de color rosa).

T. harzianum se ha relacionado con la especie teleomorfa *H. lixii* (Chaverri y col., 2003). Sin embargo, los últimos estudios moleculares rechazan el holomorfo *H. lixii/T. harzianum*, en favor de dos especies separadas (Druzhinina y col., 2010). *T. harzianum* Rifai presenta un crecimiento muy rápido, con una producción abundante de conidias que rápidamente cambian de color verde amarillento a verde oscuro. Suelen presentar pústulas rodeadas de micelio blanquecino. Los conidióforos forman una estructura piramidal, produciendo conidias de un aspecto subgloboso a ovoide, de color hialino a verde pálido (Grams y Meyer, 1998). La gran capacidad de producción de conidias de esta especie facilita su uso como ACB, ya que la mayor

tolerancia de estas esporas a condiciones medioambientales adversas, a diferencia del micelio, favorece la preparación de distintas formulaciones de productos (Verma y col., 2007). Así, por ejemplo, las suspensiones de conidias de estos hongos se han empleado para reducir las enfermedades postcosecha producidas por hongos como *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* o *Penicillium expansum* (Batta, 2007).

El control de enfermedades fúngicas y bacterianas de plantas no es el único uso que ha recibido *T. harzianum*. También se han utilizado aislados de este hongo para controlar invertebrados patógenos de la rizosfera de la planta como los nemátodos (Sahebani y Hadavi, 2008), y plagas foliares como los áfidos (Ganassi y col., 2000). *T. harzianum* también se ha empleado como promotor del crecimiento vegetal. Algunos investigadores han sugerido que estos aislados producen compuestos que actúan como hormonas del crecimiento en la planta, además de mejorar la transferencia de minerales desde el suelo a la raíz, mejorando de este modo la nutrición y, por tanto, el crecimiento de la planta (Bailey y Lumsden, 1998).

Algunos aislados de *T. harzianum* también se han utilizado como biorremediadores de ciertos productos contaminantes. Las enzimas producidas por estos hongos son capaces de degradar diferentes compuestos químicos como pesticidas y herbicidas, como el pentaclorofenol, el endosulfán o dicloro difenil tricloroetano (DDT), así como también algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (Verma y col., 2007).

4.2. Principales mecanismos de acción de *T. harzianum*

Los modos de acción de estos hongos antagonistas pueden resumirse en mecanismos directos, que engloban el micoparasitismo, la antibiosis y la competición; e indirectos, que incluyen la estimulación del crecimiento y la inducción de resistencia vegetal a estrés biótico y abiótico. Todos estos mecanismos pueden darse de forma simultánea en un mismo aislado, no siendo excluyentes ninguno de ellos. De la eficacia de cada uno de ellos o de su combinación dependerá el éxito en la supresión de la enfermedad del aislado.

4.2.1. Mecanismos directos

Micoparasitismo

El ataque directo a los fitopatógenos producido por los aislados de *T. harzianum*, basado principalmente en la secreción de enzimas hidrolíticas, es uno de los principales mecanismos de acción de estos hongos. Las principales características e importancia de este modo de acción se describirán en el Apartado 5.

Antibiosis

T. harzianum es capaz de segregar un gran cantidad de compuestos antimicrobianos capaces de afectar a los fitopatógenos. Estos metabolitos secundarios, que pueden ser tanto volátiles como no volátiles, pueden actuar mediante contacto directo con los patógenos o mediante contacto en la distancia (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Su producción puede depender del medio en el que se encuentren, así como de las condiciones y edad del cultivo. Según su estructura podemos distinguir dos tipos de metabolitos secundarios: los metabolitos de bajo peso molecular, no polares, que incluyen compuestos aromáticos, pironas, butenólidos y metabolitos derivados del isocianato, que pueden difundir en el agua y actuar a cierta distancia, y los metabolitos de alto peso molecular, denominados peptaiboles, con características anfipáticas, que pueden alterar la permeabilidad de las membranas lipídicas de las células del patógeno (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998).

Competencia por espacio y nutrientes

Los aislados de *T. harzianum* se caracterizan por presentar un rápido crecimiento, que les confiere mayor capacidad a la hora de colonizar un espacio. De este modo, compiten directamente por los mismos nichos que algunos hongos fitopatógenos (Sivan y Chet, 1989). La colonización de los sitios de unión de estos patógenos en la planta por *T. harzianum* permite reducir la enfermedad. Además, su carácter saprofítico les permite utilizar un amplio rango de sustratos, compitiendo directamente por los nutrientes presentes en el medio (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Algunos de estos nutrientes son esenciales para el desarrollo de los fitopatógenos, como el hierro, que es secuestrado del medio por la acción de sideróforos producidos por *T. harzianum* (Verma y col., 2007).

4.2.2. Mecanismos indirectos

Estimulación del crecimiento

Otro de los mecanismos antagonistas producidos por *T. harzianum* se basa en la promoción del crecimiento de la planta (Bailey y Lumsden, 1998). Diversos aislados de esta especie la estimulan el crecimiento vegetal hasta un 300%, debido a que son capaces de sintetizar determinados compuestos con carácter hormonal (Brotman y col., 2010). Estos aislados producen además diferentes ácidos orgánicos que disminuyen el pH, solubilizando el fósforo del medio, así como otros nutrientes, mejorando el desarrollo de la planta. Además, las enzimas hidrolíticas producidos por estos hongos movilizan la materia orgánica del medio, mejorando igualmente la absorción de compuestos más simples por parte de la planta, y en definitiva su estado nutricional (Verma y col., 2007).

Inducción de resistencia

Numerosos autores han revelado que las asociaciones de *T. harzianum* con la planta, así como algunos de los compuestos producidos por el hongo, favorecen la inducción de mecanismos de resistencia en la planta. La presencia del hongo y los elicitores que produce son capaces de activar mecanismos de defensa en plantas (Bailey y Lumsden, 1998), reprogramando la expresión de diferentes genes de la planta y activando diferentes rutas enzimáticas (Shoresh y col., 2010). Esta inducción de los mecanismos acelera la respuesta frente al ataque de un patógeno o un insecto, mejorando de este modo la resistencia de la planta. Una respuesta más rápida frente a un ataque disminuirá el impacto de la enfermedad o el daño producido.

5. La importancia del micoparasitismo de *T. harzianum* en el control biológico

Uno de los principales modos de acción de *T. harzianum* relacionado directamente con el control biológico de fitopatógenos se basa en su capacidad de parasitar otros hongos (Chet y col., 1998). Este mecanismo puede actuar junto a fenómenos de antibiosis y competencia. Las hifas de *T. harzianum* son capaces de detectar la presencia de un posible huésped en el medio, mediante la detección de moléculas liberadas por el posible huésped debido a la acción de las enzimas líticas producidas por *T. harzianum*. Mediante quimiotropismo, *T. harzianum* es capaz de crecer hasta el hospedador, reconociéndolo mediante lectinas específicas. Es entonces cuando *T. harzianum* es capaz de crecer rodeando al patógeno, mediante la formación de ovillos y apresorios, que atraviesan la pared celular del hongo y permiten que las hifas de *Trichoderma* penetren en el huésped (Brotman y col., 2010). Este fenómeno está ligado a la síntesis de una gran batería de enzimas líticas que degradan la pared del patógeno. Entre estas enzimas destacan las quitinasas, las β -glucanasas y las proteasas (Viterbo y col., 2002). La combinación de estas hidrolasas es capaz de lisar completamente la pared celular del hospedador, compuesta principalmente por quitina, un polímero formado por *N*-acetil-glucosamina unida mediante enlace β -1,4, o de celulosa en el caso de los oomicetos. Además, también encontramos en la pared fibras de β -glucano, polisacárido lineal de residuos de glucosa unidos por enlace β -1,3 con ramificaciones con enlace β -1,6. Todos estos compuestos están inmersos a su vez en una matriz proteica. El sistema hidrolítico encargado de lisar esta estructura ha sido profundamente estudiado en algunas especies de *Trichoderma*. De este modo, para *T. harzianum*, se han descrito hasta cinco quitinasas (CHIT42, CHIT33, CHIT37, CHIT52, y CHIT40) y dos *N*-acetil-glucosaminidasas (EXC1 y EXC2); cuatro β -1,3-glucanasas (BGN13.1, GLUC78, GLU36 y LAM1.3) y tres β -1,6-glucanasas (BGN16.1, BGN16.2, y BGN16.3); y tres proteasas (PRB1, PAPA, y PRA) (Rincón y col., 2008).

Estas actividades hidrolíticas están codificadas por genes conocidos como genes relacionados con el micoparasitismo (MGRs). El conocimiento de estos genes,

implicados directamente en el micoparasitismo, es de gran ayuda para mejorar la eficacia del empleo de estos microorganismos en control biológico. De hecho, algunas de estas mejoras pueden obtenerse mediante modificaciones genéticas. Estas técnicas se basan en la sobreexpresión de genes de interés en el aislado, o introducir nuevos genes que les confieran nuevas características implicadas en el control biológico no presentes en el aislado silvestre (Montesinos y col., 2008). Algunos autores han demostrado que la inactivación de determinados genes también puede mejorar la expresión de los MGRs, y por lo tanto el efecto de control biológico del hongo (Mendoza-Mendoza y col., 2003). Sin embargo, la aplicación de esta tecnología no siempre resulta sencilla. La introducción de determinados genes en el ACB puede afectar a la expresión de otros genes, alterando otras propiedades como su crecimiento o capacidad de colonización (Flores y col., 1997). Además, el empleo de estos organismos modificados genéticamente (OMGs) puede conllevar riesgos cuando se apliquen de forma práctica. Hay que estar seguros de que estos ACBs mejorados no afecten a las poblaciones microbianas del lugar donde se apliquen. A su vez, también es importante tomar en consideración posibles interacciones entre estos aislados y los naturales, y de las posibles transferencias de material genético entre ellos. La legislación actual permite el empleo de OMGs con unos requisitos muy estrictos y exhaustivos, recogidos en la directiva 2001/18/EC, y los posteriores reglamentos CE 1829/2003, CE 1830/2003, CE 65/2004 y CE 641/2004. Sin embargo, la UE no permite el empleo de OMGs en la agricultura ecológica, como viene descrito en el reglamento CE 834/2007.

Una alternativa a la modificación genética, sería la búsqueda de aislados que presenten de forma natural una elevada expresión de alguna de las actividades hidrolíticas anteriores. Estos aislados súper productores podrían utilizarse para mejorar la eficacia del control biológico sobre los huéspedes.

6. Métodos de detección y cuantificación de hongos

El seguimiento y monitorización de los ACBs aplicados en agricultura, incluido *T. harzianum*, requiere de herramientas que nos permitan conocer, detectar y

cuantificar la cantidad de un determinado microorganismo ACB presente en nuestra muestra. A su vez, la detección de los microorganismos responsables de una determinada enfermedad, como en el caso de *F. oxysporum*, resulta de vital importancia, ya que permitirá el poder decidir que estrategias se van a seguir y el poder buscar soluciones para su control. Dentro de la metodología disponible para este fin podemos encontrar dos tipos: **la metodología clásica**, usada tradicionalmente en microbiología, y **los métodos moleculares**, que se han desarrollado en las últimas décadas y se basan en el estudio de los ácidos nucleicos.

6.1. Metodología clásica

La detección y cuantificación de hongos del suelo es una tarea compleja. Los primeros métodos que permitían conocer la cantidad de microorganismos se centraban principalmente en las **técnicas de microscopía**. Estas técnicas se basan en el empleo de colorantes que se unen a determinadas proteínas o ácidos nucleicos presentes en los microorganismos, tiñendo así diferentes componentes de los mismos, tales como paredes celulares, núcleos, etc. Entre los colorantes más utilizados encontramos el isocianato de fluoresceína, el naranja de acridina, el bromuro de etidio, el azul fenol de anilina o el diacetato de fluoresceína. Estas tinciones sin embargo presentan algunas limitaciones, debido a las dificultades para distinguir entre diferentes especies dentro del mismo género de microorganismos. Además, estas técnicas suelen llevar asociados errores de conteo de los microorganismos una vez teñidos. Otras veces, las hifas pueden ser observadas directamente sin la necesidad de colorantes. Estas observaciones ofrecen datos de longitud de hifas que necesitan medidas lo más exactas posibles del diámetro, porcentaje de ramificación o humedad de las hifas para ser convertidas en biomasa (Raidl y col., 2005).

Durante décadas, las **técnicas de dilución en placa** en medios más o menos selectivos han sido el método más utilizado para cuantificar los hongos del suelo. Estas técnicas se basan en obtener diluciones seriadas de una muestra original para su siembra en placas con un determinado medio de cultivo. Los hongos crecerán en esas placas, y las diluciones nos permitirán conocer la cantidad de unidades

formadoras de colonias (UFCs) por unidad de peso de suelo o sustrato de cultivo. Sin embargo, la cuantificación de la comunidad fúngica con esta técnica también presenta algunas limitaciones; los datos obtenidos suelen referirse más al número de esporas de ese hongo en la muestra que a la cantidad o biomasa de ese hongo en el suelo, ya que por lo general esos parámetros no están siempre relacionados (Weaver y col., 1994). Otras limitaciones de esta técnica radican en que no todos los hongos son cultivables. Algunos autores han estimado que sólo el 17% de los hongos conocidos puede crecer en medios de cultivo (Bridge y Spooner, 2001). Este no es el caso de *T. harzianum* ni de *F. oxysporum*, ya que ambos hongos pueden crecer en medios de cultivo selectivos y generales de hongos.

Se han utilizado también diferentes **métodos químicos y fisiológicos** para cuantificar la cantidad de hongos en el suelo. Los métodos químicos se han basado en la medida de diferentes componentes del hongo, tales como la quitina y el ergosterol (Djajakirana y col., 1996; Ekblad y col., 1997). La quitina puede presentar problemas por ser un compuesto que también se encuentra en los artrópodos, lo cual puede influir en los datos obtenidos. A su vez, el contenido en ergosterol de las hifas fúngicas puede variar según la edad del micelio. Los métodos fisiológicos se basan en medidas de respiración en las muestras tras la adición de diferentes sustratos, determinando la cantidad de CO₂ producido u O₂ consumido (Weaver y col., 1994).

Cabe mencionar también en este apartado el uso de **métodos inmunológicos** para calcular la biomasa de los hongos. Los inmunoensayos ofrecen una buena opción a la hora de detectar y cuantificar los hongos crecidos en cultivos puros, si bien presentan problemas cuando se aplican en muestras que presentan varias poblaciones de distintos microorganismos (Karpovich-Tate y col., 1998). La tecnología del hibridoma, y el desarrollo de anticuerpos monoclonales, ha facilitado la detección y cuantificación de algunos hongos, entre ellos *Trichoderma* sp. (Thornton, 2008), basados en la detección de antígenos que nos permiten monitorizar la presencia de los diferentes aislados. La mayoría de estos trabajos nos ofrecen una cuantificación de la biomasa mediante ensayos ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e inmunofluorescencia (Bermingham y col., 1995, Plasencia y

col., 1996). Sin embargo, la dificultad y laboriosidad para producir anticuerpos con una alta especificidad limita mucho su empleo (McCartney y col., 2003).

6.2. Métodos moleculares

Los últimos avances en filogenia, clasificación, e identificación de hongos, así como las nuevas técnicas de detección y cuantificación de hongos (antagonistas y fitopatógenos) están basados en técnicas que incluyen la **extracción de ácidos nucleicos** (ADN y ARN) y el uso de la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**. Los métodos de extracción del ADN y ARN se basan en la homogeneización de la muestra, y rotura de las paredes celulares del hongo mediante agentes químicos como enzimas o detergentes, y mecánicos, con perlas de vidrio y agitación. Una vez rotas las células y liberados los ácidos nucleicos, se purifican con productos químicos como el fenol y el cloroformo, y se precipitan con alcoholes como el isopropanol. Además de los métodos manuales, actualmente existen numerosos protocolos y kits en el mercado de diferentes casas comerciales que ofrecen buenos resultados para la extracción de ADN y ARN de diferentes tipos de muestras.

La PCR se basa en la selección de unos cebadores (secuencias determinadas de bases de hasta 25 nucleótidos) que se unen a una región específica del genoma del hongo, permitiendo que la enzima polimerasa pueda copiar el ADN. Los sucesivos ciclos de la PCR ofrecen un producto final formado por millones de copias (amplicones) de la región del genoma seleccionada, permitiendo la obtención de una cantidad suficiente para el estudio de la biología del hongo.

La selección de diversas regiones conservadas del genoma de los hongos como dianas de los cebadores para la PCR es una práctica habitual para la identificación de microorganismos. Muchos de estos estudios se realizan en el complejo ribosomal formado por los genes 18S, 5.8S y 28S, y los espaciadores ribosomales internos (ITS1 e ITS2). Este complejo de genes se encuentra repetido múltiples veces en el genoma del hongo (Bridge y Spooner, 2001). Además, las regiones ITS presentan numerosas diferencias en su secuencia entre las distintas especies de hongos, facilitando de este modo el diseño de cebadores específicos

que hibriden en estas regiones (White y col., 1990). La secuenciación del complejo ribosomal también sirve para conocer las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies. Otros genes empleados como dianas de la PCR incluyen la β -tubulina, la topoisomerasa II o el factor de la elongación 1α , codificando todos ellos para moléculas imprescindibles en la biología del hongo.

Cuando no se tiene información acerca de la secuencia del microorganismo, o los genes estudiados están demasiado conservados para el diseño de cebadores en esas regiones, la identificación de microorganismos puede ser más complicada. En estos casos, se pueden utilizar técnicas basadas en la PCR como el **RAPD-PCR** (*random amplified polymorphic DNA*) (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col, 1990). Estas técnicas están basadas en el uso de cebadores de secuencia aleatoria que amplifican regiones al azar del genoma. Los productos amplificados ofrecen un patrón de bandas característico de cada aislado analizado. Estas bandas pueden usarse como **marcadores SCAR** (*sequence characterised amplified region*), permitiendo el diseño de cebadores o sondas específicas en estas regiones. La técnica de RAPD-PCR se ha empleado con éxito en la identificación de hongos fitopatógenos, antagonistas y micorrizas, así como en estudios filogenéticos (Schena y col., 2004).

Uno de los puntos más importantes en la detección de hongos radica en la **sensibilidad** de la técnica. La PCR ofrece mayor sensibilidad que otros métodos comentados anteriormente, tales como el cultivo en placa. Esta sensibilidad, sin embargo, puede estar afectada por la presencia de inhibidores en las muestras. La extracción de los ácidos nucleicos de los hongos de suelos, sustratos o material vegetal puede conllevar también la extracción de diferentes compuestos presentes en esos medios, tales como ácidos húmicos, taninos, ligninas, materia orgánica, etc. (Bridge y Spooner, 2001). Estos compuestos pueden interferir en las reacciones de la PCR disminuyendo la sensibilidad o incluso inhibiendo la reacción. Por ello es necesaria la obtención de protocolos de extracción y purificación capaces de eliminar estas sustancias, así como la dilución de las muestras hasta que la concentración de inhibidores no afecte a la amplificación.

Las ventajas conseguidas con la aplicación de la PCR en la detección y estudio de los hongos son muchas. A la mayor sensibilidad se unen la posibilidad de detección de una molécula diana en una mezcla compleja, y la independencia de las técnicas de cultivo, lo que reduce los tiempos de análisis. Sin embargo, entre sus principales limitaciones se encuentra su carácter no cuantitativo (Scheda y col., 2004). Heid y col. (1996) desarrollaron una técnica conocida como **PCR cuantitativa** o **PCR a tiempo real** (qPCR o *real time* PCR), que ha abierto la puerta a la cuantificación de microorganismos con PCR. El empleo de esta técnica ha revolucionado no sólo la detección de microorganismos en toda clase de muestras biológicas, sino que también ha ofrecido la capacidad de cuantificar microorganismos en dichas muestras.

7. Usos de la PCR a tiempo real en el estudio del control biológico de enfermedades

7.1. Fundamentos y metodologías de la PCR a tiempo real

Esta técnica se basa en el empleo de cebadores y marcadores fluorescentes que nos permiten medir la intensidad de la fluorescencia emitida en los distintos ciclos de la PCR (Heid y col., 1996). Esta intensidad será proporcional a la cantidad de ADN generado durante la amplificación. Esta técnica es además mucho más sensible que la PCR convencional (Lees y col., 2002).

La PCR a tiempo real incorpora el uso de moléculas fluorescentes que no interfieren en la reacción, y que indican la cantidad de amplicón que se forma en cada ciclo, permitiéndonos conocer la cantidad de producto formado a tiempo real. La intensidad de la fluorescencia en los diferentes ciclos de amplificación se recoge por un espectrofluorímetro, y la información procesada mediante diferentes algoritmos genera una curva de fluorescencia. De esta curva de fluorescencia obtenemos el valor *Ct* (*cycle threshold*) o ciclo umbral, punto en que la curva corta al umbral de detección (Heid et al., 1996) (Figura 1A). El *Ct* se define como “el ciclo de la PCR en el que se produce un aumento estadísticamente significativo de la

fluorescencia que es susceptible de ser detectado” (Schubert y col., 2003). El C_t es inversamente proporcional al logaritmo del valor de la concentración inicial del ADN diana. A mayor concentración inicial del ADN diana, el C_t se alcanzará en un ciclo más temprano.

Los valores de C_t pueden utilizarse como una medida cuantitativa del número de copias del ADN diana presentes en una muestra, al compararlos con los valores de C_t obtenidos de una curva patrón preparada con cantidades conocidas del ADN diana (Schena y col., 2004). La curva patrón se genera amplificando concentraciones conocidas del gen diana, y obteniendo su valor de C_t . A continuación, mediante una regresión lineal simple, estos valores de C_t se representan gráficamente frente al logaritmo de la concentración (Figura 1B). Algunos aspectos a tener en cuenta en la construcción de las curvas estándar en PCR a tiempo real incluyen dos factores: la eficiencia de la reacción (E) y el valor de la R^2 de la recta.

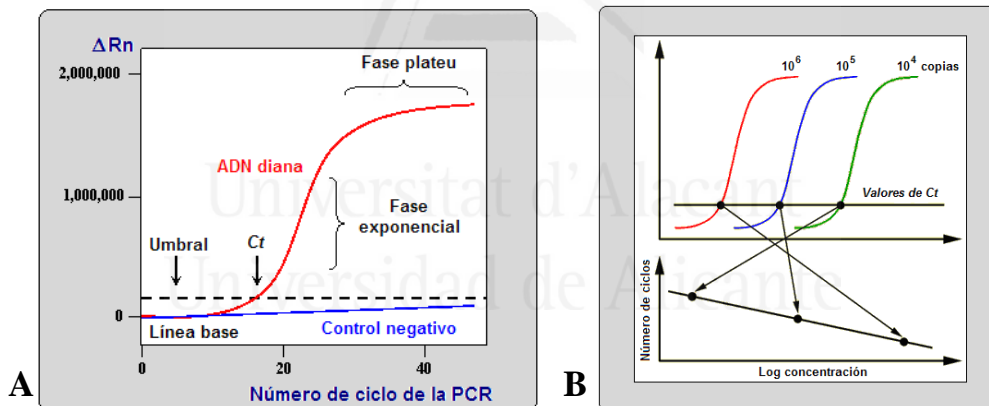


Figura 1. A) Gráfica que muestra el aumento de la fluorescencia (ΔR_n) respecto al número de ciclos de la amplificación en un experimento de PCR a tiempo real. B) Gráfica que muestra el desarrollo de la curva patrón o estándar a partir de concentraciones conocidas de ADN diana.

Debemos comprobar que la eficiencia de amplificación de las muestras es similar a la de la curva patrón. Esta eficiencia se calcula en base a la pendiente de la recta, y debe ser cercana a 2. Una pendiente de -3.32 ofrecería una eficiencia de PCR con valor 2, del 100%, indicando que por cada molécula inicial en la muestra se

obtendrán 2 tras un ciclo de PCR. El valor de R^2 de la recta también debe ser lo suficientemente consistente para poder validar el uso de la recta patrón. Curvas estándar con valores de R^2 superiores a 0.95, junto con pendientes entre -3.0 y -3.9, que corresponden a eficiencias de PCR entre 1.8 y 2.15, son adecuadas en la cuantificación con PCR a tiempo real (Zhang y Fang, 2006).

Existen diferentes metodologías que nos permiten cuantificar la cantidad de producto formado durante cada ciclo de la PCR a tiempo real. Éstas se basan en el empleo de métodos que pueden clasificarse como específicos o no específicos.

Los **métodos no específicos** incluyen el uso de moléculas fluorescentes como el SYBR® Green I (Morrison y col., 1998), BEBO® (Bengtsson y col., 2003), YO-PRO-1® (Ishiguro y col., 1995), naranja de tiazol (Benveniste y col., 1996) o bromuro de etidio (Higuchi y col., 1993); que se unen de forma inespecífica a las moléculas de ADN que se están formando en cada ciclo. De todos ellos, el más utilizado es el SYBR® Green I, que se une de forma inespecífica al surco menor de la doble hélice (Figura 2A). Este compuesto se ha utilizado ampliamente en PCR a tiempo real porque evita el diseño de sondas, y es compatible con cualquier combinación de cebadores. Es por ello mucho más barato que los métodos específicos (Smith y Osborn, 2009) que veremos posteriormente.

Sin embargo, estas aparentes ventajas llevan asociados determinados inconvenientes o limitaciones. Al ser un método inespecífico, estos colorantes se unen a todo ADN de doble cadena, incluyendo, además del amplicón esperado, otros productos inespecíficos y a los dímeros de cebadores, afectando a la sensibilidad de detección. Para paliar estas limitaciones es importante un adecuado diseño de los cebadores, optimizar las condiciones de amplificación, y calcular las curvas de fusión (*melting curves*) de los productos formados. La temperatura de fusión (T_m) de cada producto depende directamente de su secuencia, permitiendo diferenciar el amplicón deseado del resto de productos formados (Schena y col., 2004).

Los **métodos específicos** en PCR a tiempo real se basan en el empleo de sondas de oligonucleótidos marcados con fluorocromos. Estas sondas hibridan con secuencias escogidas previamente del genoma del hongo, siendo por tanto

específicas para la detección de secuencias concretas (Schena y col., 2004). Las sondas suelen estar marcadas con un fluoróforo (*reporter*) en un extremo de la molécula, responsable de la emisión de fluorescencia, y un silenciador (*quencher*) en el otro extremo que silencia la fluorescencia del fluoróforo mediante transferencia de energía de resonancia de Förster (*FRET*) (Smith y Osborn, 2009). Existen diferentes tipos de sondas basadas principalmente en su estructura, siendo las sondas TaqMan® las más utilizadas (Figura 2B). Estas sondas combinan la actividad 5' nucleasa de la *Taq* polimerasa descrita por Holland y col. (1991) junto con sondas con marcadores fluorescentes descritas por Livak y col. (1995).

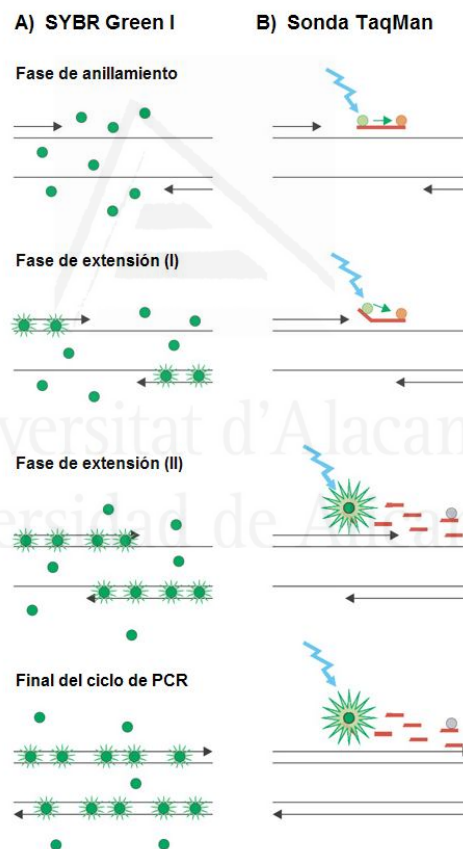


Figura 2. Metodologías en PCR a tiempo real: A) técnica no específica con SYBR Green I, y B) técnica específica con una sonda de hidrólisis (TaqMan®). Modificado de van der Velden y col. 2003.

Las sondas llevan unido un fluorocromo, normalmente FAM (6-carboxifluoresceína), TET (tetracloro-6-carboxifluoresceína), JOE (2,7-dimetoxi-4,5-

dicloro-6-carboxyfluoresceína), Cy3 (indocarbocianina), Cy5 (indo-dicarbocianina), o HEX (hexacloro-6-carboxifluoresceína); y un silenciador, siendo los más comunes TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina), MGB (*minor groove binder*), BHQ (*black hole quencher*) o BBQ (*Black Berry quencher*).

Una vez que los cebadores y la sonda hibridan en el ADN, la polimerasa comienza a elongar la cadena a partir de los cebadores. Cuando llega a la región donde la sonda se ha hibridado, la polimerasa es capaz de hidrolizar la sonda, liberando el fluoróforo de la acción del silenciador. El fluorocromo liberado es capaz de producir la fluorescencia (la longitud de onda dependerá del fluorocromo usado), que será detectada gracias a los distintos sensores del espectrofluorímetro. La principal ventaja del uso de estas sondas radica en su especificidad. Sólo cuando tanto los cebadores como la sonda hibriden en la secuencia elegida del ADN se producirá fluorescencia, evitándose de este modo la necesidad de realizar curvas de fusión. Los inconvenientes del uso de sondas radican en la complejidad de su diseño y en que poseen un mayor coste económico que los métodos no específicos como el SYBR Green I (Zhang y Fang, 2006).

7.2. Monitorización de hongos antagonistas y fitopatógenos.

El desarrollo de las técnicas basadas en la PCR, ha ofrecido nuevas herramientas para mejorar el entendimiento y el uso de agentes de control biológico y fitopatógenos en agricultura. Los primeros trabajos moleculares publicados para la detección de hongos estaban basados en el empleo de PCR convencional y marcadores SCAR obtenidos principalmente mediante RAPD-PCR, como los utilizados para *Colletotrichum coccodes* (Dauch y col., 2003), *Phoma macrostoma* (Zhou y col., 2004), *Aureobasidium pullulans* (El Hamouchi y col., 2008) o aislados de *T. vires* (Dodd y col., 2004) y *T. harzianum* (Hermosa y col., 2000) entre otros. Sin embargo todos estos trabajos coinciden en la necesidad de nuevos métodos que posibiliten no sólo la detección del hongo en la muestra, sino también su cuantificación. Cada vez encontramos un mayor número de trabajos que han aplicado la PCR a tiempo real, permitiendo conocer la cantidad de hongo presente en

el medio. Entre los hongos antagonistas que se han cuantificado con PCR a tiempo real podemos encontrar hongos nematófagos como *Plecthosphaerella cucumerina* (Atkins y col., 2003), *Paecilomyces lilacinus* (Atkins y col., 2005) y *Hirsutella rhossiliensis* (Zhang y col., 2006), hongos entomopatogénicos como *Pandora neoaphidis* (Fournier y col., 2008) y hongos micoparasíticos como *Trichoderma* sp. (Hagn y col., 2007; Kim y Knudsen, 2008) *T. atroviride* (Cordier y col., 2007; Savazzini y col., 2008) y *T. harzianum* (Rubio y col., 2005).

La aplicación de esta técnica en la detección e identificación de hongos fitopatógenos resulta fundamental, dada la importancia de diagnosticar una determinada enfermedad o patógeno afectando a un cultivo (Lievens y col., 2006). Esto ha permitido en muchos casos la sustitución de los métodos convencionales, basados en la observación de síntomas de la enfermedad de la planta y el aislamiento en medios de cultivo, que, por regla general consumen mucho tiempo y no resultan efectivos cuando se requiere un diagnóstico rápido (McCartney y col., 2003). El empleo de PCR a tiempo real en fitopatología ha permitido detectar y cuantificar numerosos hongos patógenos tales como *Pythium* sp. (Lievens y col., 2006; Schroeder y col., 2006), *R. solani* (Saylor y Yang, 2007; Okubara y col., 2008), *V. dahliae* (Lievens y col., 2006, Atallah y col., 2007), *S. sclerotiorum* (Yin y col., 2009), *Botrytis* sp. (Chilvers y col., 2007). Los aislados del género *Fusarium* también se han diagnosticado mediante PCR a tiempo real, dada la importancia de este patógeno, ya que además de generar enfermedad, es capaz de producir micotoxinas en cereales cosechados, lo que conlleva un importante riesgo para la salud humana y animal (Sarlin y col., 2006). Algunos de estos trabajos permiten diagnosticar aislados de *F. solani* (Lievens y col., 2006; Li y col., 2008), *F. pseudoculmorum* (Hogg y col., 2007), así como diferentes *formae speciales* de *F. oxysporum* (Zhang y col., 2005; Pasquali y col., 2006; Inami y col., 2010, Jiménez-Fernández y col., 2010).

Todos estos trabajos aplican PCR a tiempo real en gran variedad de muestras, principalmente en cultivos puros, suelos o material vegetal. Sin embargo, los trabajos sobre cuantificación de ACBs en sustratos orgánicos como turbas o composts empleados en semillero son escasos. No existen, por ejemplo, estudios en los que se monitorice *T. harzianum* en condiciones de semillero. Si podemos encontrar trabajos

en los que se monitoriza a *F. oxysporum* en sustrato y planta, debido a la gran importancia de este patógeno a escala mundial, aunque la mayoría de ellos tampoco se desarrollan bajo condiciones de semillero.

La PCR a tiempo real puede permitir remediar una de las principales limitaciones de las técnicas basadas en PCR, como es la falta de discriminación entre material vivo y muerto (Bridge y Spooner, 2001). Las técnicas moleculares amplifican el ADN de las muestras, sin distinguir cual proviene de células vivas o de células muertas. Existen opiniones encontradas sobre la persistencia del ADN en un suelo una vez el organismo ha muerto. Algunos autores defienden que el ADN se degrada rápidamente por nucleasas presentes en el suelo, mientras que otros apuntan que el ADN puede permanecer sin degradar durante largos periodos de tiempo formando complejos con diferentes compuestos (Schena y col., 2004). Además, en el caso de los hongos antagonistas como *Trichoderma*, la PCR a tiempo real no puede distinguir entre el ADN que proviene de micelio activo, responsable de la actividad de control biológico, del ADN proveniente de las formas inactivas como las conidias y las clamidosporas. En este caso, es importante conocer no sólo que cantidad de hongo tenemos en nuestra muestra, sino también de que cantidad de hongo activo con potencial de control biológico disponemos. Esto puede realizarse mediante la cuantificación del ARN sintetizado por los hongos activos presentes en la muestra. El ARN se retrotranscribe a ADN complementario mediante una retrotranscriptasa, lo que se conoce como **RT-PCR** (*Reverse transcription polymerase chain reaction*). Esta técnica puede combinarse además con la metodología de PCR a tiempo real, lo cual se conoce como **real time RT-PCR** o **qRT-PCR**.

7.3. Estudio y expresión de genes de interés en biocontrol

Uno de los primeros pasos en el estudio de los ACBs radica en la localización de genes en su genoma que pudieran estar relacionados con las propiedades de control biológico (Massart y Jijakli, 2007). La mayoría de estos genes se buscan entre las enzimas líticas responsables de la lisis de la pared celular del fitopatógeno. Conocer y aislar los genes responsables de la actividad quitinasa, glucanasa y

proteasa presentes en un determinado ACB permitirá obtener información del potencial biocontrol de ese determinado microorganismo (Rincon y col., 2008). Estos genes suelen localizarse mediante el estudio de datos previos o extrapolando a otros modelos existentes. Un gen identificado para una determinada especie de *Trichoderma* puede utilizarse para desarrollar cebadores degenerados (con bases modificadas que pueden reconocer diferentes bases del ADN diana). Estos cebadores permitirán amplificar la secuencia de ese gen en nuestro aislado. La secuenciación de estos genes aportará las bases para posteriores estudios moleculares, tales como estudios de funcionalidad y de expresión para ese determinado gen. La información obtenida mediante secuenciación resulta de vital importancia para especies en las que aun no se conoce el genoma completo, tal es el caso de *T. harzianum*. A día de hoy, las especies de *Trichoderma* secuenciadas incluyen *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens* (JGI: Joint Genome Institute, US Department of Energy).

El estudio del ARN y de las proteínas de un determinado ACB permite conocer cómo ese microorganismo puede actuar frente a un fitopatógeno. Las técnicas basadas en la extracción del ARN, tanto del ARN mensajero (ARNm) como del ARN ribosómico (ARNr), ayudan a conocer los niveles de expresión de un determinado gen bajo unas condiciones determinadas, tales como la presencia o ausencia de un sustrato o de componentes del patógeno. La qRT-PCR no solo se puede emplear para cuantificar la cantidad de microorganismo activo presente en una muestra, como hemos comentado anteriormente, sino que puede además emplearse en transcriptómica, para cuantificar el nivel de transcripción de los genes de interés de los ACBs (Massart y Jijakli, 2007). Mediante la qRT-PCR podemos cuantificar la expresión relativa de un determinado gen frente a un gen de referencia (*housekeeping gene*). Estos genes de referencia permiten cuantificar variaciones en la expresión del gen a analizar, lo que se conoce como normalización. Estos genes se expresan abundantemente en todas las células, y su expresión no suele variar mucho bajo diferentes condiciones. Algunos de estos genes de referencia incluyen los que codifican para las actinas, tubulinas, ciclofilinas, fosforibosiltransferasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, o para ARNr 18S o 28S entre otros (Thellin

y col., 1999; Huggett y col., 2005). La selección de uno u otro de estos genes depende generalmente del tipo de tejido u organismo que se estudie. Los principales genes utilizados en la normalización de los datos en especies de *Trichoderma* incluyen el gen de la actina (Reithner y col., 2007; Pucher y col., 2010), el gen 18S ARNr (Marcello y col., 2010), el gen del factor 1 α de la elongación de la traducción (Seidl y col., 2006, Gruber y col., 2011), y el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Gruber y col., 2011).

Todos estos estudios transcriptómicos pueden ir acompañados de estudios proteómicos en los que se estudia la actividad de la proteína sintetizada por el ACB. Estos estudios pueden estudiar el proteoma global del microorganismo o bien enfocarse en una proteína en concreto, y suelen resultar mucho más complejos que los estudios transcriptómicos (Massart y Jijaki, 2007).

La aplicación de estas herramientas, en combinación con otras técnicas tradicionales ya existentes, permitirá la monitorización, detección, cuantificación e identificación de los hongos tanto beneficiosos como fitopatógenos, ayudando a entender cuales son sus modos de acción y mejorando por tanto el uso de estos ACBs frente a los fitopatógenos.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

II. Interés del trabajo y objetivos

Interés del trabajo. Objetivos

La demanda de un sector importante de la población comprometido con el medio ambiente junto con las nuevas regulaciones de la Unión Europea en materia de agricultura, están llevando a la eliminación y sustitución de productos químicos, tales como fungicidas y fertilizantes, que conllevan enormes problemas medioambientales y para la salud humana. La búsqueda de alternativas compatibles con la naturaleza y la salud ha llevado al auge de la agricultura ecológica. El desarrollo de este nuevo paradigma en la agricultura ha llevado a un aumento de la demanda de plántulas producidas de forma ecológica en los semilleros. En dichas instalaciones, las infecciones por patógenos son muy probables debido a que presentan las condiciones óptimas para su desarrollo y dispersión.

El cultivo de melón presenta gran importancia a nivel mundial, siendo España el principal productor europeo. La producción de plántulas de melón en semillero es sensible a diferentes patógenos, siendo *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, responsable de la fusariosis vascular, uno de los más importantes debido a las graves pérdidas que produce (Gómez y Tello, 2000a, Soriano-Marín y col., 2006). El control biológico de la enfermedad se presenta como una buena alternativa al control químico. El control biológico se basa principalmente en el empleo de sustratos basados en composts supresivos, capaces de reducir la incidencia de la enfermedad (Alavouvette y col., 2006), junto con el empleo de antagonistas de organismos fitopatógenos, conocidos como agentes de control biológico (ACBs).

Trichoderma harzianum es uno de los ACBs más eficaces frente a distintas enfermedades de plantas. Los aislados de *T. harzianum* presentan diferentes mecanismos de acción contra los patógenos fúngicos, incluyendo el micoparasitismo. El estudio de la capacidad micoparasítica de los aislados de *T. harzianum*, centrándonos en la expresión de genes y producción de enzimas hidrolíticas, puede permitir la selección de los aislados más eficaces, sin necesidad de producir organismos modificados genéticamente, cuyo uso no está permitido en agricultura ecológica.

El empleo de *T. harzianum* como ACB requiere sin embargo de herramientas que permitan su monitorización en los sustratos en semillero, así como el estudio de su capacidad de control biológico. Del mismo modo, la identificación y seguimiento del patógeno *F. oxysporum* también es de gran interés, todo ello encaminado a controlar y reducir la incidencia de la enfermedad en el semillero.

Los métodos moleculares, basados en el ADN y la PCR desarrollados en las últimas décadas están permitiendo el estudio en profundidad de antagonistas y fitopatógenos, debido principalmente a la mayor sensibilidad y eficacia de estas técnicas (Schena y col., 2004). El empleo de estas técnicas, en concreto de la PCR a tiempo real y sus diferentes metodologías, pueden ayudarnos a profundizar en el conocimiento de los mecanismos de control biológico de un determinado ACB (Massart y Jijakli, 2007). Además, la combinación de estas técnicas con métodos clásicos como el cultivo en placa o la microscopía puede mejorar el manejo de este ACB en su lugar de aplicación.

De este modo, el **objetivo principal** de esta Tesis Doctoral consistió en mejorar el conocimiento, mediante el empleo de técnicas moleculares, de la aplicación de *T. harzianum* como agente de biocontrol frente a la fusariosis vascular del melón en semillero.

Este objetivo principal ha sido desarrollado a través de los siguientes **objetivos específicos**:

- Desarrollo de un sistema molecular para la detección específica y cuantificación de *T. harzianum*, tanto de formas activas como no activas, en sustratos orgánicos tales como turba y compost.
- Desarrollo de un sistema molecular para la detección temprana de *F. oxysporum* en sustrato y plántulas de melón bajo condiciones de semillero.
- Estudio de la capacidad micoparasítica de diferentes aislados de *T. harzianum* frente a *F. oxysporum* f. sp. *melonis*.
- Evaluación del empleo de residuos ricos en quitina para mejorar la capacidad quitinolítica de *T. harzianum* en sustratos orgánicos frente a *F. oxysporum* f. sp. *melonis*.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

III. Capítulo primero

Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potencial extrapolation to the hyphal biomass

Cuantificación del agente de control biológico *Trichoderma harzianum* mediante PCR a tiempo real y su potencial extrapolación a biomasa fúngica.

Resumen

Las especies del género *Trichoderma*, y en particular la especie *T. harzianum*, se han utilizado con éxito en agricultura contra un gran número de hongos fitopatógenos. El uso de estos microorganismos, denominados agentes de control biológico (ACBs), en sustratos y suelos como estrategia de biocontrol, necesita de herramientas adecuadas que permitan la monitorización de este ACB. La PCR a tiempo real es una herramienta potencialmente eficaz para la cuantificación de hongos en muestras medioambientales. El objetivo de este estudio consistió en el desarrollo y aplicación de un método basado en la técnica de PCR a tiempo real para cuantificar *T. harzianum*, y la extrapolación de los datos conseguidos mediante esta técnica a valores de biomasa fúngica. Para ello, se diseñaron y probaron un conjunto de cebadores, así como una sonda *TaqMan* en la región ITS del genoma del hongo. La amplificación del ADN de *T. harzianum* obtenida fue correlacionada con medidas de biomasa, obtenidas con microscopía y análisis de imagen, de la longitud de las hifas. La correlación obtenida entre copias de ITS y biomasa fue de 0.76. La extrapolación de la cantidad de copias de ITS, calculadas mediante PCR a tiempo real, en cantidades de biomasa fúngica ofrece una medida más precisa de la cantidad de hongo presente en el sustrato.

*Este artículo ha sido publicado en la revista **Bioresource Technology** (2010) 101 (8), 2888-2891*

Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass

Rubén López-Mondéjar^{a*}, Anabel Antón^a, Stefan Raidl^b, Margarita Ros^a, José Antonio Pascual^a

^aDepartment of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), P.O. Box 164, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

^bDepartment Biologie I und GeoBioCenter^{LMU}, Organismische Biologie: Systematische Mykologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Menzinger Strasse 67, 80638 München, Germany

ABSTRACT

The species of the genus *Trichoderma* are used successfully as biocontrol agents against a wide range of phytopathogenic fungi. Among them, *Trichoderma harzianum* is especially effective. However, to develop more effective fungal biocontrol strategies in organic substrates and soil, tools for monitoring the control agents are required. Real-time PCR is potentially an effective tool for the quantification of fungi in environmental samples. The aim of this study consisted of the development and application of a real-time PCR-based method to the quantification of *T. harzianum*, and the extrapolation of these data to fungal biomass values. A set of primers and a TaqMan probe for the ITS region of the fungal genome were designed and tested, and amplification was correlated to biomass measurements obtained with optical microscopy and image analysis, of the hyphal length of the mycelium of the colony. A correlation of 0.76 between ITS copies and biomass was obtained. The extrapolation of the quantity of ITS copies, calculated based on real-time PCR data, into quantities of fungal biomass provides potentially a more accurate value of the quantity of soil fungi.

Keywords: Hyphal biomass, ITS copies, real-time PCR, TaqMan probe, *Trichoderma harzianum*

1. Introduction

Fungal species of the genus *Trichoderma* (e.g. *Trichoderma harzianum*) have been used as biological control agents in agriculture for many years (Papavizas, 1985; Chet, 1987). These antagonistic fungi act as mycoparasites of phytopathogenic fungi, secreting hydrolytic enzymes and antibiotic compounds (Howell, 2003), competing for space and nutrients with other microorganisms (Hjeljord and Tronsmo, 1998), stimulating plant growth and induce acquired resistance mechanism in the presence of biotic and abiotic stress (Bailey and Lumsden, 1998).

One of the most important aspects of the use of this biological control agent is the application of tools which permit its monitoring (quantification) in soils and organic substrates (compost). The use of real-time PCR together with fluorescent-tagged markers has allowed the quantification of numerous species of

mycorrhizal fungi, phytopathogens and biological control agents. In contrast to classical techniques such as plate counting (Atkins et al., 2005) and biomass measures of fungal components (e.g. chitin, ergosterol or fatty acids) (Ekblad et al., 1997; Olsson et al., 2003) or monoclonal antibody technology (Thomton, 2008), the real-time PCR technique is faster and has higher sensitivity. Its hands-free post-PCR capacity avoids possible contamination (Schena et al., 2004).

The aim of this work was to extrapolate the amount of DNA quantified by real-time TaqMan PCR into fungal biomass calculated from microscopic measurements of hyphal length and image analysis (Raidl et al., 2005).

2. Methods

2.1. Fungal strains and growth conditions

The experiments were carried out with the isolate *T. harzianum* T-78 (CECT 20714, Spanish Type Culture Collection) selected from green compost. The other isolates were obtained from CECT (Table 1). The isolates were grown in potato

* Corresponding author. Tel.: +34 96839 6397; fax: +34 96839 6213.

E-mail address: rmondejar@cebas.csic.es (R. López-Mondéjar).

doi:10.1016/j.biortech.2009.10.019

Capítulo 1

Table 1

Fungal isolates used in this study and evaluation of the specificity of different combinations of primers (ITS1 S: 5'-TACAACCTCCAAACCAATGTA-3'; ITS1 R: 5'-CCGTGTGAAAGTTTGGATTCATT-3'; ITS1 F: 5'-GGATCATTACCGAGTTTACAACCTCC-3'; ITS1 A: 5'-AGACGGCCACCCGCTAAGGGAG-3') and probe (ITS1 TM Fam: 5'-FAM-AACCTTATTGTATACCCCTCGCGGT-TMR-3' (FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxy-tetramethylrhodamine)) in the real-time PCR assay.

No.	Species	Isolate	Origin	Amplification ^a		
				ITS1 S/ITS1 R	ITS1 S/ITS1 A	ITS1 F/ITS1 A
1	<i>T. harzianum</i>	CECT 20435	Spain	+	+	+
2	<i>T. harzianum</i>	CECT 2926	UK	+	+	+
3	<i>T. harzianum</i>	CECT 2930	India	+	+	+
4	<i>T. harzianum</i>	CECT 2413	USA	+	-	-
5	<i>T. harzianum</i>	CECT 2424	Unknown	+	+	+
6	<i>T. harzianum</i>	CECT 20714 (T78)	UK	+	+	+
7	<i>T. asperellum</i>	CECT 20539	Spain	-	-	-
8	<i>T. atroviride</i>	CECT 20513	Spain	-	-	-
9	<i>T. reesei</i>	CECT 2414	Unknown	-	-	-
10	<i>T. saturnisporium</i> (<i>Bionectria pseudochroleuca</i>)	CECT 20109	USA	-	-	-
11	<i>T. inhamatum</i>	CECT 20512	Spain	-	-	-
12	<i>T. hamatum</i>	CECT 20103	India	-	-	-
13	<i>T. longibrachiatum</i>	CECT 20105	Egypt	-	-	-
14	<i>T. longibrachiatum</i>	CECT 2412	UK	-	-	-
15	<i>T. pseudokoningii</i>	CECT 2937	Antarctic	-	-	-

^a +: Significant amplification; -: no significant amplification.

dextrose agar (PDA) at 26 °C in darkness for 7 days, and stored at 4 °C on PDA slant tubes; and in potato dextrose broth (PDB) at 26 °C in darkness, at 150 rpm, for 48 h.

2.2. DNA extraction

Two millilitres of each PDB culture were centrifuged at 18,000g; the mycelium was washed with 1.5 ml of TE buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) and centrifuged again. Five-hundred microliters of re-suspension buffer (50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, pH 7.5) was shaken with glass beads (425–600 µm) (Sigma-Aldrich Inc., USA) in an oscillating mill (MM400, Retsch, Germany). One hundred and fifty microliters of potassium acetate solution (3 M, pH 4.8) were added to the supernatant and the mixture centrifuged at 18,000g. The supernatant was collected and 600 µL of isopropanol were added for nucleic acid precipitation, followed by centrifugation at 18,000g for 20 min at 4 °C. The precipitate was washed with ice-cold 70% ethanol, centrifuged, dried at room temperature, re-suspended in 50 µL of water (AccuGENE, Cambrex, USA) and treated with RNase (20 mg/L) for 20 min at 37 °C.

2.3. Specific primers and probe design

The ITS region of the ribosomal DNA of *T. harzianum* was amplified (Takara PCR Thermal Cycler Dice TM, Takara Bio Inc., Japan), sequenced (White et al., 1990), and the sequences were compared with sequences available in the NCBI database for other *Trichoderma* species. Different sets of primers and a TaqMan probe (Table 1) were designed inside this region and analyzed for specificity using the NCBI Blast feature (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Different combinations of these primers were tested against different isolates of the genus *Trichoderma* (Table 1).

2.4. Real-time PCR conditions

Real-time PCR amplifications were performed in a total volume of 8 µL using a LightCyclerTM (Roche Diagnostics, Germany). The reaction mixtures contained a final concentration of 0.3 µM each primer, 0.025 µM TaqMan probe, 4 µL Premix Ex TaqTM (Takara Bio Inc., Japan), 0.8 µL template DNA and 1.84 µL sterile water (AccuGENE Cambrex, USA). The thermal cycling conditions for amplification were an initial denaturation at 95 °C for 35 s, followed by 35 cycles each consisting of a denaturation step at 95 °C for 5 s, annealing at 64 °C for 15 s, and extension at 72 °C for 15 s. The amplification results were analysed with LightCyclerTM Software 4 (Roche Applied Science, Switzerland).

2.5. Development of a standard curve

A fragment of 621-bp from the selected ITS region of the *T. harzianum* T-78, was cloned into vector PCR 2.1 (Invitrogen, USA). The plasmid was used to transform *Escherichia coli* DH5α cells (Invitrogen, USA) and purified with a QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, Germany); the presence of inserts was determined by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) using four restriction enzymes: *TaqI*, *EcoRI*, *HinfI* and *AluI* (Fermentas, USA). The DNA concentration of the plasmid standard solution was measured spectroscopically (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) and was related to the known molecular weight of a single plasmid molecule. The concentration was adjusted to the number of 10¹¹ ITS copies, and the standard was diluted in 10-fold steps to obtain the standard curve.

2.6. Hyphal biomass measurement

Hyphal biomass was estimated according to Raidl et al. (2005), with some modifications: *T.*

harzianum mycelium was grown in slides covered with Hagem's agar (Stenlid, 1985), and kept in humid chambers at room temperature for 72 h. Slides with appropriate hyphal growth (homogeneous and not too dense) were selected, covered with a cover slip with a grid pattern on the surface (Raidl et al., 2005) and photographed with a digital camera (Kappa DX 20L, Kappa opto-electronics, Gleichen, Germany) through a Dialux 22 microscope (Leitz, Wetzlar, Germany) at a magnification of 63x. The pictures were processed with Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems Inc., USA) in order to enhance the contrast of the hyphae against the background in the pictures.

The hyphal length of the whole slide was measured with the Win-Rhizo software 4.0b (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada) and was changed to hyphal volume using the cylinder equation ($V = L * \pi * r^2$; L: hyphal length; r: hyphal radius), assuming that the hyphae of *Trichoderma* are perfectly cylindrical and using an average value of the hyphal diameter (calculated taking into account the percentages of thin and thick branches). This volume was converted to fungal dry weight using the conversion factors (*f*: specific weight for fungal hyphae: 0.22 g cm⁻³) (Fogel and Hunt, 1978) obtained from the literature Raidl et al. (2005).

2.7. Quantification of ITS copy numbers

Immediately after the pictures were taken, the mycelia grown on the slide was collected carefully for DNA extraction (FastDNA SPIN Kit for Soil, Q-BIOgene, USA), following the manufacturer's instructions with some modifications: (i) the samples were homogenized in an oscillating mill for 1 h, to ensure total cell lysis, (ii) the SPIN™ Filter was eluted up to four times with a greater volume of sterile water to ensure that all DNA was collected. The number of ITS copies of each elution was calculated using the LightCycler™ System as described above, using five replicates of undiluted, 1/10 and 1/100 diluted DNA template. An external standard and a negative control (water) were run in every real-time PCR reaction. The amount of detected ITS copies was calculated with the Roche Software by interpolating the cycle threshold with the standard curve, and extrapolating to the total sample volume.

3. Results and discussion

3.1. Specificity of the primers and probe

Currently, the ribosomal RNA gene cluster provides the main region for molecular studies with fungi, such as detection, quantification and phylogenetic studies of different taxa (Bridge and Spooner, 2001; Lievens et al., 2006). The different primers designed inside ITS1 and ITS2 regions only showed significant matches with *T. harzianum*

sequences (BLAST). The set of primers ITS1 S/ITS1 R, which amplified a 211-bp fragment, together with the fluorescent probe ITS1 TM Fam, amplified all the *T. harzianum* isolates used in this study (Table 1). The design of primers in the ITS1 region allows the detection of low quantities of target DNA, due to the presence of multiple different copies of rRNA spacer regions in the fungus genome, increasing the specificity of the real-time PCR (Bridge and Spooner, 2001).

The development of this primers and probe allows the detection of *T. harzianum* in pure cultures and therefore, in the future, could be used for detection and quantification in soils and organic substrates.

3.2. Calibration of real-time PCR

Serial dilutions of the plasmid over 10 orders of magnitude were carried out to obtain a standard curve for the real-time PCR calibration, starting with an initial concentration of 247.12 ng DNA/μL, which was calculated as representing 1×10^{11} ITS copies/μL. A standard curve ranging over six orders of magnitude (from 10⁷ to 10² ITS copies/μL) was achieved by plotting the cycle thresholds against the logarithm of the initial number of target copies, with an efficiency of 2.037. The external standard used routinely for quantification in sample materials was 10⁵ ITS copies/μL. The number of specific ITS gene copies potentially give a more real measure of the amount of the microorganism present in the sample (Savazzini et al., 2008), vs. other studies that use standard curves based on 10-fold serial dilutions of DNA for the calibration of the real-time PCR, and expressing the results as quantity of DNA (Filion et al., 2003; Lievens et al., 2006).

3.3. Extrapolation curve for the number of ITS copies vs. biomass measurements

One of the main aspects of this work was the conversion of the number of copies of a specific gene into fungal biomass, making possible the extrapolation of the obtained data to a more realistic and easily understandable unit such as biomass.

Seven slides were appropriate (hyphal growth was homogenous and not too dense) for this extrapolation. The mycelia were grown on different, independent slides. After 3 days, the total lengths of the mycelia were measured and converted into fungal dry biomass. The average hyphal radius was also measured in the slides accounting for the different hyphal thickness. The hyphal thickness was classified in thick and thin hyphae (higher or lower than 4–4.5 μm); the percentage of both types of hyphae in the culture was calculated and was 37.9% for thinner hyphae and 62.1% for thicker hyphae. The hyphal length, volume, and biomass results, with the number of ITS copies present on each slide are

Table 2
Data for the hyphal length, hyphal volume, hyphal biomass and ITS copies of each slide.

Slide	Total ITS copies	Hyphal length (mm)	Hyphal volume (mm ³)	Hyphal biomass (mg)	10 ⁶ ITS copies/mg	10 ⁴ ITS copies/mm
1	5.01 × 10 ⁷	2605.30	0.1686	37.10	1.35	1.92
2	7.01 × 10 ⁷	2415.30	0.1563	34.39	2.04	2.90
3	8.17 × 10 ⁷	2357.00	0.1526	33.56	2.43	3.47
4	2.80 × 10 ⁷	876.50	0.0567	12.48	2.25	3.20
5	1.09 × 10 ⁶	759.00	0.0491	10.81	0.10	0.14
6	2.56 × 10 ⁷	1387.90	0.0898	19.76	1.30	1.84
7	1.72 × 10 ⁸	3274.52	0.2119	46.63	3.68	5.25

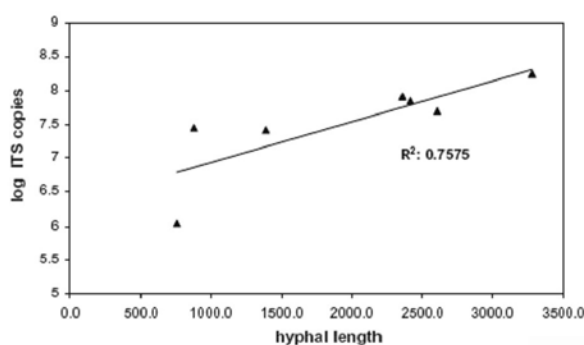


Fig. 1. Regression of hyphal length and ITS copies number.

shown in Table 2. Combining these two methods, a mean of 2.67×10^4 ITS copies per mm of hypha was derived. The correlation of the two sets of data by linear regression analysis gave an R^2 value of 0.7575 (Fig. 1), for the equation: $y = 1.48 \times 10^{-5} x + 1047.28$. This standard curve permits the extrapolation to *T. harzianum* biomass through a specific probe. It could be stated that the obtained value was not so high, but this may be correlated to the mycelium age, in spite of the fact that slides were processed in the same way during the 3-days inoculation. The selection of the area to photograph also influenced this correlation, related to the type fungal growth. During the colony development, the hyphae are stretching, branching and fusing, and show different morphological features along the mycelium (Buller, 1933). All these changes involve cytoplasmic and nuclear movements through the mycelium. These movements are well documented in other ascomycetes species like *Gelasinospora tetrasperma*, *Blastomyces dermatitis* (Dowding and Bakerspigel, 1954), and *Aspergillus nidulans* (Suelmann and Fischer, 2000). These phenomena can influence the nuclear distribution in the older hyphae in comparison to younger hyphae of the mycelium, and consequently the correlation.

The average radius value used in this work was based on measurements of the colonies, accounting for the percentage and abundance of thicker and thinner hyphae. This relation could vary depending on the culture medium or mycelium age, influencing the biomass data, and ultimately the ITS/ biomass correlation.

Moreover, the number of slides analyzed would also be related to the correlation obtained, due to the

analysis time that each one entails (Raidl et al., 2005).

4. Conclusions

The application of real-time PCR using a specifically-designed probe has been demonstrated to be an effective tool for the quantification of *T. harzianum* in pure cultures; moreover its extrapolation to biomass measures, like fungal dry weight in this study, would allow a more practical knowledge of the quantity of fungus. The potential use of this technique in soil and compost would be very useful, improving the application of the fungus in field, and thus improving the results in their employment against phytopathogenic fungi; although future experiments would be necessary to improve and optimize this technique in soil or compost samples, more complex than pure cultures.

Acknowledgements

This work was supported by the I3P Programme from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain, and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 607/B7).

References

- Atkins, S.D., Clark, I.M., Pande, S., Hirsch, P.R., Kerry, B.R., 2005. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiol. Ecol. 51, 257–264.
- Bailey, B.A., Lumsden, R.D., 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: Harman, G., Kubicek, C. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 185–204.
- Bridge, P., Spooner, B., 2001. Soil fungi: diversity and detection. Plant Soil 232, 147–154.
- Buller, A.H.R., 1933. Researches on Fungi, vol. 5. Longman, London.
- Chet, I., 1987. *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet, I. (Ed.), *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. John Wiley and Sons, New York, pp. 147–160.

- Dowding, E.S., Bakerspigel, A., 1954. The migrating nucleus. *Can J. Microbiol.* 1, 68–78.
- Ekblad, A., Wallander, H., Näsholm, T., 1997. Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytol.* 138, 143–149.
- Filion, M., St-Arnaud, M., Jabaji-Hare, S.H., 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.* 53, 67–76.
- Fogel, R., Hunt, G., 1978. Fungal and arboreal biomass in a western Oregon Douglasfir ecosystem: distribution patterns and turn-over. *Can. J. For. Res.* 9, 245–256.
- Hjeljord, L., Tronsmo, A., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman, G., Kubicek, C. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 185–204.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87, 4–10.
- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A.C., Cammue, B., Thomma, B., 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Sci.* 171, 155–165.
- Olsson, P.A., Larson, L., Bago, B., Wallander, H., van Aarle, I.M., 2003. Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 159, 1–10.
- Papavizas, G.C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23, 23–54.
- Raidl, S., Bonfigli, R., Agerer, R., 2005. Calibration of quantitative real-time TaqMan PCR by correlation with hyphal biomass and ITS copies in mycelia of *Piloderma croceum*. *Plant Biol.* 7, 713–717.
- Savazzini, F., Oliveira Longa, C.M., Pertot, I., Gessler, C., 2008. Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in soil. *J. Microbiol. Meth.* 73, 185–194.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., Gallitelli, D., 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 893–908.
- Stenlid, J., 1985. Population structure of *Heterobasidion annosum* as determined by somatic incompatibility, sexual incompatibility, and isozyme patterns. *Can. J. Bot.* 63, 2268–2273.
- Suelmann, R., Fischer, R., 2000. Nuclear migration in fungi – different motors at work. *Res. Microbiol.* 151, 247–254.
- Thornton, C.R., 2008. Tracking fungi in soil with monoclonal antibodies. *Eur. J. Plant Pathol.* 121, 347–353.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., San Diego, CA, pp. 315–322.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

IV. Capítulo segundo

qRT-PCR quantification of the biological control agent *Trichoderma harzianum* in peat and compost-based growing media.

Cuantificación del agente de control biológico *Trichoderma harzianum* en medios de crecimiento basados en turba y compost mediante qRT-PCR.

Resumen

Para asegurar un uso adecuado de *Trichoderma harzianum* en agricultura se necesitan datos lo más precisos posibles que permitan monitorizar adecuadamente su población. Por ello, el objetivo de este trabajo consistió en comprobar la efectividad de la qRT-PCR (PCR a tiempo real con transcripción reversa) para cuantificar *T. harzianum* en diferentes sustratos de cultivo frente a otras técnicas tales como el conteo en placa y la qPCR (PCR a tiempo real). Los resultados mostraron que tanto las técnicas de dilución en placa como la qPCR ofrecen patrones similares en la cuantificación de *T. harzianum*, basadas en un rápido incremento inicial en la población fúngica que disminuye con el tiempo. Sin embargo, los datos obtenidos con qRT-PCR mostraron una curva de hongo activo totalmente diferente, con un crecimiento inicial retardado, que se fue incrementando a lo largo del experimento. Estos resultados mostraron que *T. harzianum* puede crecer en los sustratos empleados, y que la qRT-PCR puede ofrecer una representación más clara de las poblaciones de *T. harzianum* activo. Además, los compost inoculados con *T. harzianum* mostraron una menor tasa de infección por *F. oxysporum* (67%) y una menor pérdida de peso fresco (11%), en comparación con la turba inoculada con *T. harzianum* (90% de infección, y 23% de pérdida de peso fresco).

*Este artículo ha sido publicado en la revista **Bioresource Technology** (2011) 102 (3), 2793-2798*

qRT-PCR quantification of the biological control agent *Trichoderma harzianum* in peat and compost-based growing media

Robert Beaulieu^{a,1}, Rubén López-Mondéjar^{a,1,*}, Fabio Tittarelli^b, Margarita Ros^a, José Antonio Pascual^a

^aDepartment of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), P.O. Box 164, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

^bCentro per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Centro di ricerca per lo studio delle relazioni tra pianta e suolo (CRA-RPS), via della Navicella, 2, 00184 Rome, Italy

ABSTRACT

To ensure proper use of *Trichoderma harzianum* in agriculture, accurate data must be obtained in population monitoring. The effectiveness of qRT-PCR to quantify *T. harzianum* in different growing media was compared to the commonly used techniques of colony counting and qPCR. Results showed that plate counting and qPCR offered similar *T. harzianum* quantification patterns of an initial rapid increase in fungal population that decreased over time. However, data from qRT-PCR showed a population curve of active *T. harzianum* with a delayed onset of initial growth which then increased throughout the experiment. Results demonstrated that *T. harzianum* can successfully grow in these media and that qRT-PCR can offer a more distinct representation of active *T. harzianum* populations. Additionally, compost amended with *T. harzianum* exhibited a lower *Fusarium oxysporum* infection rate (67%) and lower percentage of fresh weight loss (11%) in comparison to amended peat (90% infection rate, 23% fresh weight loss).

Keywords: Biocontrol, compost, Fungal quantification, qRT-PCR, *Trichoderma harzianum*

1. Introduction

Species within the genus *Trichoderma* are some of the most widely-utilized fungal biological control agents (BCAs) in agriculture (Papavizas, 1985; Chet, 1987). The antagonistic effect by *Trichoderma* sp. has been demonstrated against a range of agriculturally-devastating phytopathogenic microorganisms, including those within the genus *Fusarium*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* and *Pythium* (Hjeljord and Tronsmo, 1998). These fungi act as mycoparasites by secreting hydrolytic enzymes such as chitinase and glucanase, which break down cell walls (Kubicek et al., 2001). *Trichoderma* sp. also produces antibiotic compounds which influence biocontrol capacity (Howell, 2003). Their rapid growth allows these species to directly compete for space and nutrients with phytopathogens

(Sivan and Chet, 1989; Hjeljord and Tronsmo, 1998) while also indirectly fighting infection through stimulating plant growth and inducing acquired resistance mechanisms in the plant (Bailey and Lumsden, 1998). Isolates of the specie *T. harzianum* have been proven to work effectively as a biological control agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) (Bernal-Vicente et al., 2009).

In general, composts possess some capacity to increase disease suppression in horticultural crops and improve plant health (Borrero et al., 2004; Ros et al., 2005; Deepak et al., 2008). Efficacy of composts has also been shown to vary depending on specific biotic and abiotic characteristics (Ros et al., 2005; Alabouvette et al., 2006). For this reason, it has become a practice to inoculate composts with suppressive microorganisms such as *Trichoderma* sp. to improve suppressive efficacy, which facilitates microorganism survival and waste material reutilization (López-Mondéjar et al., 2010b). To effectively utilize such microorganisms, accurate monitoring of the active agent in natural environments is essential.

Conventional fungal monitoring techniques include the counting of colony forming units (CFUs) grown on selective media, and chemical, biological

* Corresponding author. Tel.: +34 96839 6397; fax: +34 96839 6213.

E-mail address: rmondejar@cebas.csic.es (R. López-Mondéjar).

¹ Both authors contributed equally as primary author. doi:10.1016/biortech.2010.09.120

and immunological assays (Lievens et al., 2006). However, these methods are time-consuming, require taxonomical expertise, and can lack specificity for the organism in interest (Thorn et al., 1996; McCartney et al., 2003). Molecular techniques have shown to compensate for many of the limitations of conventional analyses. Studies have shown the effectiveness of real-time quantitative PCR (qPCR) in the detection and quantification of fungal populations through the use of isolated DNA from both pure culture and soil-borne samples (Filion et al., 2003; Lievens et al., 2006; López-Mondéjar et al., 2010a). However, a major shortcoming of this approach is the isolation and amplification of DNA obtained from non-active fungal material (conidia, dead mycelia, etc.) which result in inaccurate data, such as the overestimation of populations (Bridge and Spooner, 2001; Lievens et al., 2006). To better understand the propagation in growing media and biological control impacts of an agent such as *T. harzianum*, information pertaining to the active form is vital. These data can be obtained through the reverse transcription of RNA combined with real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and could provide a more meaningful assessment than current DNA approaches (Atkins et al., 2003).

The objective of this study was to demonstrate, for first time, the ability to quantify active *T. harzianum* in peat and compost growing media via qRT-PCR by targeting the fungal ITS region during crop infection with FOM under greenhouse nursery conditions. This study also evaluated the efficacy of the use of green compost amended with *T. harzianum* as a growing media.

2. Methods

2.1. Fungal strains

Organic substrates were amended with the biological control agent, *T. harzianum* T-78 (CECT 20714, Spanish Type Culture Collection). The fungus was grown in darkness on potato dextrose agar (PDA, 39 g L⁻¹) at 28°C. After 5 days, three agar plugs (5 mm diameter) were taken from the leading edge of fungal growth, placed in a flask containing 250 mL of potato dextrose broth (PDB, 24 g L⁻¹), and incubated in darkness for 7 days at 28 °C on a rotary shaker at 150 rpm. Conidia were collected by centrifugation (9,000g, 20 min), rinsing twice with sterile distilled water, and filtering through 101 quartz wool. *T. harzianum* was immobilized in a bentonite mixture following the protocol by Bernal-Vicente et al. (2009).

FOM was isolated from melon plants exhibiting disease symptoms following the protocol by Nash and Snyder (1962). The fungus was grown in PDA and PDB and conidia were collected in the same manner as described above.

Table 1
Physicochemical and chemical characteristics of peat and green compost.

Parameter	Peat	Green compost
pH	6.34	7.73
Total organic carbon (%)	49.4	52.1
Electrical conductivity (mS/cm)	0.51	1.17
Total N (%)	0.97	1.27
Total K (%)	0.60	0.43
Total P (%)	0.70	0.75
Total Ca (%)	0.52	2.53
Total Mg (%)	1.22	0.30
Total Na (%)	0.08	0.05
Total Cu (mg/kg)	12.0	83.0
Total Zn (mg/kg)	90.0	28.4
Total Mn (mg/kg)	43.1	38.9

2.2. Organic growing media

Peat and green compost were used as organic growing media for cultivating melon plants under greenhouse conditions. The main physicochemical and chemical characteristics are reported in Table 1. Both media were inoculated with bentonite-immobilized *T. harzianum* (final concentration: 10⁷ CFU g⁻¹ substrate) following Bernal-Vicente et al. (2009).

Both, green compost amended with *T. harzianum* T-78 combined with peat (1:1 w:w) and peat amended with *T. harzianum* T-78 were used as growing media for the melon seedlings.

2.3. Experimental design

The experiment was carried out under greenhouse nursery conditions. One polystyrene container (150 wells per container) was used for each growing media. One melon seed (*Cucumis melo* L. cv. Giotto) was sown in each well of the polystyrene containers. Melon seedlings were germinated in darkness at 25 °C over 72 h. After germination, the polystyrene containers were placed in a greenhouse and the plants were irrigated manually as needed. Once the first true leaf appeared (14 days after germination), half of the plants in each growing media were inoculated with 3 mL of a FOM conidial suspension to achieve a final concentration of 10⁵ conidia g⁻¹ substrate. The treatments in this experiment were: (1) green compost (Green + Th), (2) green compost inoculated with FOM (Green + Th + Fo), (3) peat (Peat + Th), and (4) peat inoculated with *F. oxysporum* (Peat + Th + Fo). Ten samples from each treatment were collected at 5, 12 and 25 days after inoculation with FOM (D.A.I.). After collection, 1 cm of the stem was removed from each plant for FOM-infection culture analysis and the fresh and dry weight (after 72 h at 60 °C) was recorded. One half of each substrate was stored at 4 °C for determination of colony forming units (CFU) and humidity (obtained by sample dehydration and then calculating percent water composition); the other half was ground with liquid nitrogen and stored at -80 °C for nucleic acid extraction.

2.4. FOM infection analysis

To determine FOM infection, plant tissue was assayed on PDA medium. Stem sections of 1 cm were surface-sterilized with a 1% sodium hypochlorite solution for 5 min, rinsed with sterile water, dried on sterile filter paper, and placed on PDA. Plates were incubated at 28 °C for 5 days in darkness, after which FOM colonization of plant tissue was analyzed.

2.5. Nucleic acid isolation

2.5.1. DNA isolation

DNA was isolated from five samples of each substrate treatment at different sampling times with the FastDNA SPIN Kit for Soil (Q-BIOgene). Two hundred and fifty milligrams of substrate was utilized for each sample following the manufacturer's protocol with some modifications: (1) the samples were homogenized in an oscillating mill for 1 h and (2) the SPIN™ Filter was eluted with 150 µL of sterile water.

2.5.2. RNA isolation and cDNA synthesis

RNA was isolated from five samples of each substrate treatment at different sampling times with the RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MoBio). The manufacturer's protocol was followed, utilizing 1 g of substrate for each sample. The concentration and quality of the isolated RNA samples were subjected to spectrophotometric analysis (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher scientific Inc.). Eight hundred nanograms of total RNA were treated with DNase (Sigma) according to the manufacturer's protocol. The absence of DNA in the samples was confirmed by qPCR (LightCycler™ system, Roche Diagnostics) and all negative samples were converted to cDNA by the ThermoScript RT-PCR System following the manufacturer's protocol (Invitrogen) with the gene-specific primer ITS1 (White et al., 1990).

2.6. Quantification of *T. harzianum* populations

2.6.1. Colony forming units (CFUs)

The population of *T. harzianum* was measured by a serial dilution method to obtain the CFU g⁻¹ substrate. Five samples from each treatment were diluted in sterile quarter-strength Ringer solution and plated on PDA amended with Rose Bengal (50 mg L⁻¹) and streptomycin (100 mg L⁻¹). Plates were incubated for 4 days at 28 °C and CFUs were counted.

2.6.2. Real-time quantitative PCR with DNA/cDNA

T. harzianum populations were quantified from isolated DNA and RNA converted to cDNA by a real-time TaqMan PCR system utilizing the primer pair ITS1 S and ITS1 R and the TaqMan probe ITS1 TM Fam, and extrapolated against a standard curve as

described by López-Mondéjar et al. (2010a) with few modifications: (1) three replicates of 1:5 diluted samples for DNA and 1:2 diluted for cDNA were run and (2) the real-time PCR was carried out in a reaction with a total volume of 10 µL; 0.3 µM of each primer, 0.025 µL of TaqMan probe, 5 µL of Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc.), 2.3 µL sterile water, and 1.0 µL template DNA/cDNA. The amplification results were analyzed with LightCycler™ Software 4 (Roche Applied Science).

2.7. Statistical analysis

Plant weight, CFU, DNA, and cDNA were analyzed by three-way analysis of variance (ANOVA) with substrate, pathogen and time as factors. Comparisons between means were made using Tukey post hoc test at ($P < 0.05$). A Pearson correlation was made between CFU, DNA, cDNA, fresh plant weight and percent infection. The statistical software SPSS 15.0 was used for the analysis (SPSS Inc.).

3. Results

3.1. Quantification of *T. harzianum*

Over the three monitoring time points, the colonization of *T. harzianum* in the growing media was studied by the CFU counting technique and quantitative real-time PCR of DNA and cDNA (Figs. 1 and 2).

Growing media samples were serially diluted and plated on PDA to determine the *T. harzianum* population. The number of CFU g⁻¹ substrate of *T. harzianum* was affected by the growing media, pathogen presence, and sampling time (Table 2). The colonization of *T. harzianum* (CFU g⁻¹ substrate) in peat reached significantly higher values (log 7–log 8) than in green compost (log 5–log 6) throughout the experiment (Fig. 1). All treatments achieved the greatest concentration at the second time point. Treatments inoculated with FOM achieved higher concentrations of *T. harzianum* in comparison to their respective non-inoculated treatment throughout the experiment (Fig. 1). No other *Trichoderma* isolates were found on the plates.

Quantitative real-time PCR showed that the different growing media, the inoculation or non-inoculation of the pathogen (FOM), and sampling time all showed significant effects on the number of ITS copies µg⁻¹ nucleic acid for both DNA and cDNA samples of *T. harzianum*. Furthermore, the interactions between all three of these variables were significant (Table 2).

The number of ITS copies g⁻¹ substrate from DNA of *T. harzianum* was significantly higher in peat (log 9.9–9.3) than in green compost (log 8.5–8.0). Treatments with FOM inoculation achieved higher concentrations of *T. harzianum* over the course of the

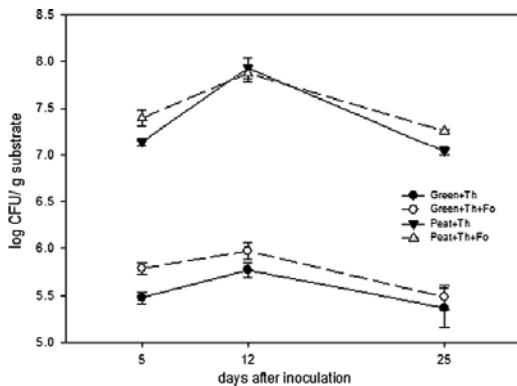


Fig. 1. Quantification of *T. harzianum* T-78 in substrates via CFU determination over course of the experiment.

experiment in comparison to their respective non-inoculated treatment (Fig. 2A).

The quantification of the active populations of *T. harzianum* was successfully observed using ITS region expression from RNA samples synthesized into cDNA. The active population of *T. harzianum*, measured by ITS copies μg^{-1} RNA, was significantly higher in peat than in green compost (Fig. 2B). The number of ITS copies μg^{-1} RNA increased significantly throughout the experiment in both growing media. In peat, there was an increase from log 3.33–3.67 to log 4.92–5.10 (39–48%) and, in green compost, an increase from log 2.45–2.79 to log 4.45–4.80 (72–82%) (Fig. 2B). In general, both treatments inoculated with FOM showed an increasing activity of *T. harzianum* throughout the three time points (Fig. 2B).

3.2. Disease resistance in melon plants

Fresh plant weight was significantly affected by the growing media, presence of FOM, and monitoring time points (Table 2). Additionally, the interaction between these three factors was significant for fresh weight (Table 2). The absence of FOM resulted in a significant increase in fresh plant weight over time, while the presence of FOM held plant weights constant throughout the experiment (Fig. 3). Plants grown in peat demonstrated a significantly higher fresh weight than plants grown in green compost (Fig. 3). A positive and significant correlation, $r = 0.540$ ($P < 0.01$), was observed for the relationship between the number of CFU g^{-1} substrate of *T. harzianum* and fresh weight. Furthermore, a positive and significant correlation, $r = 0.954$ ($P < 0.01$), was observed for the relationship between DNA (ITS copies g^{-1} substrate) and CFU (CFU g^{-1} substrate), but no relationship was found with RNA (ITS copies μg^{-1} of RNA).

At 25 D.A.I., the melon plants grown in green compost inoculated with *T. harzianum* T-78 had lost an average fresh tissue weight of 11%, while plants

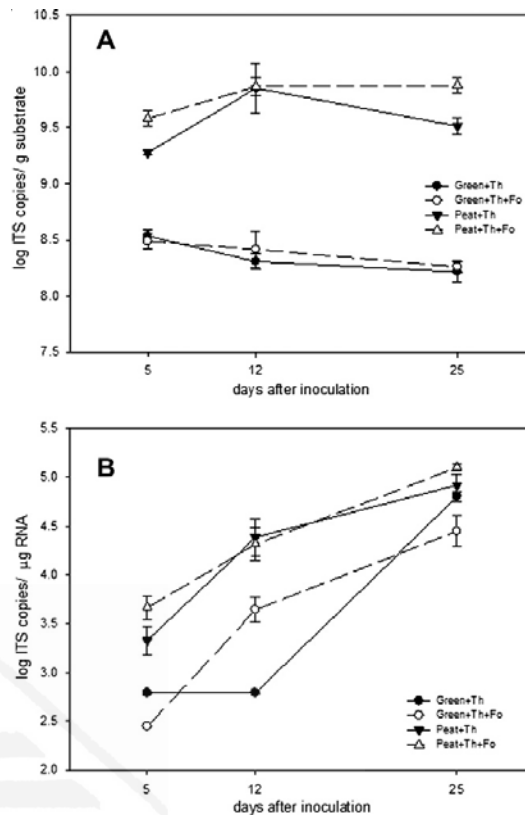


Fig. 2. Quantification of *T. harzianum* T-78 in substrates (A) utilizing isolated DNA (values are shown as the log conversion of the ITS copies g^{-1} of substrate) and (B) utilizing cDNA synthesized from isolated RNA (values are shown as the log conversion of the ITS copies μg^{-1} of RNA).

grown in peat inoculated with *T. harzianum* had lost an average fresh tissue weight of 23%. These results were due to a higher infection rate of plants grown in peat (90%) compared to those grown in green compost (67%). At 25 D.A.I., the different growing media had a significant effect on the foliar P and K content (Table 3), with plants grown in green compost achieving a significantly higher P and K content than those grown in peat (Table 3). Foliar N content was not affected by growing media. None of nutrient contents (N, P and K) were affected by the presence of the pathogen (Table 3).

4. Discussion

The monitoring and quantification of *T. harzianum* in green compost and peat during melon growth showed that the population obtained by plated serial dilutions and real-time PCR had a significant and high correlation $r = 0.954$ ($P < 0.01$). These results indicate the possibility of replacing plated serial dilutions of fungal cultures with real-time PCR,

Table 2
Results of three-factors ANOVA (growing media, pathogen and time) for fresh plant weight, CFUs, DNA and cDNA data.

	Fresh plant weight		CFU		DNA		cDNA	
	F	P	F	P	F	P	F	P
Growing media	528.92	0.000	27837.77	0.000	4194.39	0.000	1573.06	0.000
Pathogen	5.94	0.017	257.10	0.000	46.71	0.000	45.88	0.000
Time	217.54	0.000	1109.551	0.000	16.77	0.000	2803.50	0.000
Pathogen × time	128.79	0.000	32.627	0.000	3.75	0.027	46.50	0.000
Growing media × time	2.93	0.058	127.52	0.000	86.44	0.000	192.39	0.000
Growing media × pathogen	58.11	0.000	8.878	0.004	26.63	0.000	30.34	0.000
Growing media × pathogen × time	52.50	0.000	26.264	0.000	9.65	0.000	226.93	0.000

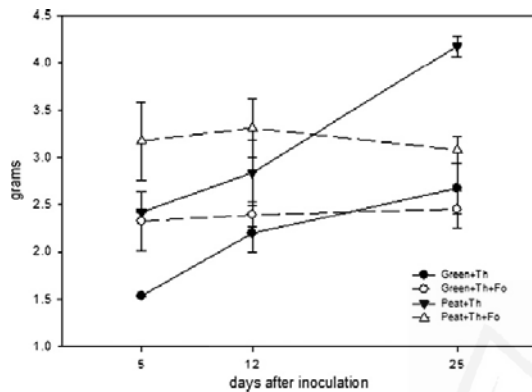


Fig. 3. Fresh plant weight over course of the experiment.

which is a faster and easier technique and provides higher sensitivity and specificity (Schena et al., 2004). However, plating of serial dilutions and real-time PCR have limitations in their ability to provide results which exclusively reflect active fungal populations due to the inclusion of both active (mycelia) and inactive (conidia or dead mycelia) fungal forms (Bridge and Spooner, 2001; Lievens et al., 2006).

In order to effectively utilize *T. harzianum*, it is essential to know the activity of the BCA population in amended substrates. The rhizosphere of plants is the growth site of this BCA as well as the infection site of many pathogens, resulting in a pathogen-BCA interaction that ultimately maintains *T. harzianum* activity (Lo et al., 1998). Due to the importance of this relationship, we have developed a new system for monitoring and quantifying the active population of *T. harzianum* in green compost and peat growing media. This system is based on a quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) as suggested by Anderson and Parkin (2007). Their work stated that precursor rRNA molecules reside in the cells of active fungi for a sufficient amount of time to allow for RT-PCR amplification of ITS regions prior to their removal by post-transcriptional cleavage. The data obtained from cDNA quantification of active *T. harzianum* populations (measured as the number of ITS copies μg^{-1} RNA) in different organic growing media showed a dramatic departure from quantification curves obtained through DNA quantification (total *T. harzianum* population

measured as the number of ITS copies g^{-1} substrate).

The active population of *T. harzianum* obtained through qRT-PCR continually increased during melon plant cultivation in both organic substrates. This indicated that *T. harzianum* survived and grew in the rhizosphere of the plant, resulting in the expression of its biological control mechanisms that provide the ability to control the pathogen (Lo et al., 1998). This type of growth curve of *T. harzianum* was not observed when using other quantification techniques. Real-time PCR data showed a decreasing *T. harzianum* population during the experiment, presumably due to initial quantification of inactive forms of DNA present in the substrate (conidia). At 5 D.A.I., the amplified DNA was mainly a result of the high concentration of spores inoculated into the media as indicated by the low quantification level of active mycelium (represented by a minimal value of ITS copies μg^{-1} RNA). The quantity of *T. harzianum* spores in the substrates decreased by the end of the experiment, although this reduction was offset by the increase in ITS copies from active mycelial DNA throughout the experiment. This change from the inactive to active form of the BCA can only be observed with the qRT-PCR system. This study is the first to quantify the active BCA (*T. harzianum*) in substrate, while previous works have only quantified the total BCA present in soil (Savazzini et al., 2008; Longa et al., 2009).

Total *T. harzianum* populations (ITS copies g^{-1} substrate) and active *T. harzianum* populations (ITS copies μg^{-1} RNA) were greater in peat than in green compost. This was possibly due to the competition between *T. harzianum* and other microorganisms present in the compost (Alabouvette et al., 2006). The different physical and chemical properties of the substrates could also have effected *T. harzianum* colonization and the expression of its biocontrol mechanisms (Smith and Goodman, 1999). Despite this, the activity of the BCA increased throughout the experiment, with and without the pathogen present in the system. These results offer information on the activity of the *T. harzianum* population over time and in different substrates. A higher BCA activity could be linked to an enzymatic system involved in the biological control effect. For this reason, studies which analyze the role of gene expression in the biocontrol process would be of great interest.

The utilization of green compost led to a 23% lower FOM infection rate at 25 D.A.I. compared to

Table 3
N, P and K content of melon plants after 25 days after inoculation. Results of two-factors ANOVA (growing media, pathogen).

	N (%)		P (%)		K (%)	
Green + Th	0.853 (0.05)		0.65 (0.05)		2.36 (0.17)	
Green + Th + FOM	0.966 (0.03)		0.70 (0.05)		2.58 (0.11)	
Peat + Th	0.930 (0.10)		0.40 (0.04)		1.79 (0.38)	
Peat + Th + FOM	0.984 (0.10)		0.41 (0.06)		1.92 (0.24)	
	N		P		K	
	F	P	F	P	F	P
Growing media	1.5	0.256	68.41	0.000	18.431	0.003
Pathogen	3.87	0.085	1.161	0.313	1.482	0.258
Growing media × pathogen	0.710	0.424	0.272	0.616	0.101	0.785

peat. Plants grown in green compost lost 11% in fresh weight compared to 23% fresh weight loss for plants grown in peat. These data support the use of suppressive compost as viable alternative to the peat employment in greenhouse nurseries as biological control of *F. oxysporum*. Similar results were observed by several authors with different pathogens (Cotxarrera et al., 2002; Trillas et al., 2006; López-Mondéjar et al., 2010b; Sant et al., 2010). These results indicate that *T. harzianum* is not the only factor in the biocontrol effect of green compost, since green compost amended with the BCA showed a smaller active population of *T. harzianum* compared to peat throughout the experiment. Compost also provides a substrate for microorganisms which improve the antagonistic effect against pathogens by competing for space, creating antibiosis, or inducing plant resistance against pathogens (Hoitink and Boehm, 1999; De Clercq et al., 2004). The inoculation of BCAs such as *T. harzianum* in green compost helps to reduce the incidence and severity of plant diseases, due to the interactions between the plant, pathogen and the microbial community (Alabouvette et al., 2006; Vinale et al., 2008) and ensure and enhance the suppressive effect of compost (De Ceuster and Hoitink, 1999). Also, all plants had good macronutrient content 25 D.A.I., which was not affected by the presence or absence of FOM. Plants grown in green compost showed a significantly higher level of P and K compared to plants grown in peat. This effect would be due to the chemical and physical characteristics of green compost, determined by a high organic matter content which involves a slow releasing of nutrient during the growing stage, enhancing the melon plant nutrition (Kleifeld and Chet, 1992).

5. Conclusion

The use of the ITS region to monitor active *T. harzianum* populations has proven to be successful and can help us to learn more about fungal activities in different growing media. In addition, the use of green compost amended with *T. harzianum* in horticulture and agriculture as growing media offers a new outlet to recycle waste materials and reduce the non-renewable use of peat, and the substitution of

chemical fungicides and fertilizers into compost-amended mixes.

Acknowledgements

This work was supported by the I3P Programme from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain. The authors would like to thank the Fulbright Commission in Spain for funding the stay of Robert Beaulieu at CEBAS-CSIC.

References

- Alabouvette, C., Olivain, C., Steinberg, C., 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 329–341.
- Anderson, I.C., Parkin, P.I., 2007. Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. *J. Microbiol. Meth.* 68, 248–253.
- Atkins, S.D., Clark, I.M., Sosnowska, D., Hirsch, P.R., Kerry, B.R., 2003. Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real-time PCR, selective media, and baiting. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4788–4793.
- Bailey, B.A., Lumsden, R.D., 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 185–204.
- Bernal-Vicente, A., Ros, M., Pascual, J.A., 2009. Increased effectiveness of the *Trichoderma harzianum* isolate T-78 against *Fusarium* wilt on melon plants under nursery conditions. *J. Sci. Food Agric.* 89, 827–833.
- Borrero, C., Trillas, M.I., Ordovás, J., Tello, J.C., Avilés, M., 2004. Predictive factors for the suppression of *Fusarium* wilt of tomato in plant growth media. *Phytopathology* 94, 1094–1101.
- Bridge, P., Spooner, B., 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant Soil* 232, 147–154.
- Chet, I., 1987. *Trichoderma* – application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet, I. (Ed.), *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. John Wiley and Sons, New York, pp. 147–160.

- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M.I., Steinberg, C., Alavouvette, C., 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biol. Biochem.* 34, 467–476.
- De Ceuster, T.J.J., Hoitink, H.A.J., 1999. Prospects for composts and biocontrol agents as substitutes for methyl bromide in biological control of plant diseases. *Compost Sci. Util.* 7, 6–15.
- De Clercq, D., Vandesteene, L., Coosemans, J., Ryckeboer, J., 2004. Use of compost as suppressor of plant diseases. In: Lens, P., Hamelers, B., Hoitink, H.A.J., Bidlingmaier, W. (Eds.), *Resource Recovery and Reuse in Organic Solid Waste Management*. IWA Publishing, London, pp. 317–337.
- Deepak, P., Saran, L., Lal, G., 2008. Control of wilt and blight diseases of cumin through antagonistic fungi under in vitro and field conditions. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 36, 91–96.
- Filion, M., St-Arnaud, M., Jabai-Hare, S.H., 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.* 53, 67–76.
- Hjeljord, L., Tronsmo, A., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 185–204.
- Hoitink, H., Boehm, M., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 427–446.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87, 4–10.
- Kleifeld, O., Chet, I., 1992. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. *Plant Soil* 144, 267–272.
- Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Lorito, M., 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* 83, 11–24.
- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A.C.R.C., Cammue, B.P.A., Thomma, B.P.H.J., 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Sci.* 171, 155–165.
- Lo, C.T., Nelson, E.B., Hayes, C.K., Harman, G.E., 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology* 88, 129–136.
- Longa, C.M.O., Savazzini, F., Tosi, S., Elad, Y., Pertot, I., 2009. Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1549–1557.
- López-Mondéjar, R., Antón, A., Raidl, S., Ros, M., Pascual, J.A., 2010a. Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass. *Bioresour. Technol.* 101, 2888–2891.
- López-Mondéjar, R., Bernal-Vicente, A., Ros, M., Tittarelli, F., Canali, S., Intrigliolo, F., Pascual, J.A., 2010b. Utilization of citrus compost-based growing media amended with *Trichoderma harzianum* T-78 in Cucumis melo L. seedling production. *Bioresour. Technol.* 101, 3718–3723.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A., Ward, E., 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manage. Sci.* 59, 129–142.
- Nash, S.M., Snyder, W.C., 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soil. *Phytopathology* 52, 567–572.
- Papavizas, G.C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23, 23–54.
- Ros, M., Hernández, M.T., García, C., Bernal, A., Pascual, J.A., 2005. Biopesticide effect of green compost against *Fusarium* wilt on melon plants. *J. Appl. Microbiol.* 98, 845–854.
- Sant, D., Casanova, E., Segarra, G., Avilés, M., Reis, M., Trillas, M.I., 2010. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T-34 on *Fusarium* wilt and water usage in carnation Brown on compost-based growth medium. *Biol. Cont.* 53, 291–296.
- Savazzini, F., Longa, C.M.O., Pertot, I., Gessler, C., 2008. Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. *J. Microbiol. Meth.* 73, 185–194.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., Gallitelli, D., 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 893–908.
- Sivan, A., Chet, I., 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79, 198–203.
- Smith, K.P., Goodman, R.M., 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 473–491.
- Thorn, R.G., Reddy, C.A., Harris, D., Paul, E.A., 1996. Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4288–4292.
- Trillas, M.I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C., Avilés, M., 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biol. Cont.* 39, 32–38.
- Vinale, F., Sivasithamparan, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M., 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1–10.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., San Diego, CA, pp. 315–322.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

V. Capítulo tercero

SCAR-based real-time TaqMan PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions

Detección temprana de *Fusarium oxysporum* mediante PCR a tiempo real basada en un marcador SCAR en plántulas de melón bajo condiciones de semillero.

Resumen

Los aislados del hongo *Fusarium oxysporum* son responsables de enfermedades devastadoras en numerosas especies de plantas, causando enormes pérdidas en los cultivos tanto a nivel de semillero como en campo. Es por ello que se necesitan herramientas adecuadas que nos permitan detectar la presencia de este patógeno de una manera temprana tanto en el sustrato como en la planta. Este fue el objetivo de este estudio, donde se desarrollaron un par de cebadores específicos (FOX S y FOX R) y una sonda *TaqMan* (FOX TM) para la cuantificación de *F. oxysporum* basándonos en un marcador SCAR obtenido mediante RAPD-PCR. Este sistema se utilizó para monitorizar la presencia de *F. oxysporum* tanto en el sustrato como en los tejidos vegetales de plántulas de melón en semillero. El sistema permitió la detección y cuantificación del patógeno en solo 48 horas, comparado con los 5-6 días que se necesitan con los métodos clásicos de cultivo en placa, además de ofrecer una mayor especificidad y sensibilidad.

Este artículo se encuentra en revisión.

SCAR-based real-time TaqMan PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions

Rubén López-Mondéjar*, Robert Beaulieu, Margarita Ros, José Antonio Pascual

Department of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), P.O. Box 164, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

ABSTRACT

Isolates of the fungus *Fusarium oxysporum* cause some of the most devastating plant diseases, leading to significant crop losses in both the greenhouse nursery and field environments. Because of this, tools that permit early pathogen detection are essential. This study demonstrates such a tool. A specific primer set (FOX S and FOX R) and TaqMan probe (FOX TM) for *F. oxysporum* quantification were developed from a SCAR marker derived from RAPD-PCR. This system was used to monitor the presence of *F. oxysporum* in the substrate and the vegetative tissue of melon seedlings growing under greenhouse conditions. Detection and quantification data was obtained within 48 hours with the new technique, compared to 5-6 days for the classical plate culture method, while also providing greater specificity and sensitivity.

Keywords: SCAR marker, *Fusarium oxysporum*, Fusarium wilt, greenhouse nursery, real-time TaqMan PCR

1. Introduction

The fungus *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. includes some of the most significant plant pathogens in the world. The diverse *formae speciales* of this fungus affect numerous crops of economical importance and infection at the seedling level in greenhouse nurseries can compound problems associated with crop loss and pathogen dispersal. Examples of this fungus and its hosts include *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato (Cotxarrera et al., 2002), *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation (Sant et al., 2010), *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in watermelon (Zhang et al., 2005), *F. oxysporum* f. sp. *basilici* in sweet basil (Reunevi et al., 2002) and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in cucumber (Pavlou and Vakalounakis, 2005). In a number of instances, *F. oxysporum* infection becomes the greatest obstacle in producing healthy seedlings. Infection within the greenhouse also jeopardizes the ability of otherwise healthy plants to be transplanted into the field. Fusarium wilt of muskmelon (*Cucumis melo* L.), caused by *F. oxysporum* f. sp. *melonis* W.C. Snyder & H. N. Hans (FOM), is one of the most significant

diseases in Spain, with impacts in both the greenhouse nursery and field environments (Suárez-Estrella et al., 2004).

The main sources of FOM inoculum include growing substrates, water and contaminated seeds (Waller et al., 2008, Al-Sadi et al., 2010). This disease is difficult to control and eradicate due to the optimal conditions within greenhouse nurseries for the growth and spread of the fungus (Gómez and Tello, 2000). Currently, no effective curative treatments are available for FOM infection (Lievens et al., 2008). Moreover, the transplantation of infected plants not exhibiting clear symptoms favors pathogen dispersal, making the elimination of *F. oxysporum* from the field environment extremely difficult (Suárez-Estrella et al., 2004, Zhang et al., 2005).

For these reasons, the detection and monitoring of *F. oxysporum* within growing substrates and plant tissue during the early growth phases is desirable. Current methods used for pathogen detection include visual confirmation based on disease symptoms (Baayen, 2000) and isolation of the fungus using a selective culture medium (Komada, 1975). Challenges associated with these methods are that selective media is not species/strain-specific, proper identification can be time-consuming and non-definitive, and results are not immediately available due to the time required for fungal growth.

Molecular methods based on polymerase chain reaction (PCR), such as real-time PCR, offer advantages over classical detection methods

* Corresponding author. Tel.: +34 96839 6397; fax: +34 96839 6213.
E-mail address: rlmondejar@cebas.csic.es (R. López-Mondéjar).

because they are sensitive, reliable, and quick for precise quantification (Scheda et al., 2004). Real-time PCR markers for genus/species/strain identification of microorganisms are normally developed from specific regions of conserved genes such as 18S rRNA, the internal transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2), or translation elongation factor alpha gene (Filion et al., 2003; López-Mondéjar et al., 2010). However, these conserved regions may not be variable enough to detect differences between strains. In such cases, it may be possible to use a sequence characterized amplified region (SCAR) marker developed from genomic regions of unknown coding function (Lievens et al., 2008) derived from a random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Williams et al., 1990).

The aim of this study was to develop and validate a real-time PCR method, based on a SCAR marker and TaqMan PCR system, to detect and quantify *F. oxysporum* in asymptomatic melon seedlings and in their organic substrates prior to field planting. Early detection of *F. oxysporum* would allow

for the proper removal of infected melon seedlings from the population to be transplanted, avoiding pathogen dispersal into the field and lowering the economic losses suffered by greenhouse nurseries and farmers due to failed melon crops.

2. Materials and methods

2.1. Fungal isolates and DNA extraction

The isolates of fungi utilized in our study to validate the specificity and sensitivity of the real-time TaqMan PCR are listed in Table 1. Isolates were grown on potato dextrose agar (PDA, 39 g L⁻¹) at 28 °C in darkness, and were stored on PDA slants at 4 °C. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (CEBAS 1014), isolated from infected melon plants from a greenhouse nursery in Murcia, Spain, was used to inoculate melon seedlings.

To obtain DNA extractions, fungal samples were grown by placing agar plugs with 7-day old mycelium

Table 1. Fungal isolates used in this study and evaluation of specificity for primers FOX S/ FOX R and probe FOX TM.

Collection Code ^a	Isolate	Host	Origin	Amplification with TaqMan System
CECT 2218	<i>Fusarium roseum</i>	Unknown	Unknown	-
CECT 20232	<i>Fusarium solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Unknown	-
CECT 20569	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Italy	-
CECT 2368	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	<i>Citrullus lanatus</i>	Unknown	+
CECT 2715	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	USA	+
CECT 20270	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	<i>Dianthus</i> sp.	Argentina	+
CECT 2869	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	<i>Gladiolus</i> sp.	USA	+
ATCC 204369	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Greece	+
CECT 20474	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	<i>Cucumis melo</i>	Almería, Spain	+
CEBAS 1013	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	<i>C. melo</i>	Alicante, Spain	+
CEBAS 1014	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	<i>C. melo</i>	Murcia, Spain	+
CEBAS 1015	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	<i>C. melo</i>	Murcia, Spain	+
CEBAS 1016	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	<i>C. melo</i>	Murcia, Spain	+
CEBAS 1017	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	<i>C. melo</i>	Murcia, Spain	+
CEBAS 1018	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	<i>C. melo</i>	Murcia, Spain	+
CEBAS 1019	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	<i>C. melo</i>	Murcia, Spain	+
CEBAS 0078	<i>Trichoderma harzianum</i>	Unknown	UK	-
CEBAS 1050	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Lycopersicon</i> sp.	Murcia, Spain	-
CEBAS 1051	<i>Phytophthora</i> sp.	Unknown	Murcia, Spain	-
CECT 2365	<i>Pythium ultimum</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	Spain	-
CECT 2815	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	Spain	-
CECT 20715	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Fragaria</i> sp.	Huelva, Spain	-
CECT 20202	<i>Acremonium cucurbitacearum</i>	<i>C. melo</i>	Unknown	-
CECT 2769	<i>Sclerotinia sclerotium</i>	<i>Medicago sativa</i>	The Netherlands	-
CECT 2963	<i>Monosporascus cannonballus</i>	<i>C. melo</i>	Valencia, Spain	-

^a: CECT: Spanish Type Culture Collection; CEBAS: Culture Collection from Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), ATCC: American Type Culture Collection.

in potato dextrose broth (PDB, 24 g L⁻¹). Samples were placed on a rotary shaker at 100 rpm and incubated at 28 °C in darkness (to prevent the formation of conidia) for 3 days. Mycelium was collected and the DNA was extracted via cell lysis with glass beads and re-suspension buffer (50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, pH 7.5) in an oscillating mill and precipitated with isopropanol (López-Mondéjar et al., 2010). The concentration of the extracted DNA was measured spectroscopically (NanoDrop, ND-1000, Thermo Fisher scientific Inc., USA).

2.2. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and TaqMan System

DNA from different *Fusarium* sp. (Table 1) was amplified with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique using 8 oligonucleotides (Table 2). These primers were used individually as well as paired to amplify the fungal DNA. Amplification was performed in a Takara PCR Thermal Cycler Dice, and was carried out in 25 µL of total volume containing 200 ng of DNA template, 0.4 µM of random primer, 0.2 µM of dNTPs mix (Qbiogene), 1.0 U of Taq polymerase (Biotools), 2 µM of MgCl₂ (Biotools), 1.0 U of Reaction Buffer (Biotools) and sterile water (Molecular Biology Grade Water, AccuGENE). The amplification was carried out with the following program: initial denaturation at 94 °C for 3 min, 35 cycles at 94 °C for 30 s, 36 °C for 30s and 72 °C for 90s, and a final extension at 72 °C for 5 min. Products were separated by electrophoresis in 1x Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer on 1.5% agarose

gels. A specific band (SCAR marker), obtained from a polymorphic and distinguishable banding profile, was excised and DNA was eluted with 25 µL of sterile water (Molecular Biology Grade water, AccuGENE), and stored overnight at 4 °C. DNA was re-amplified with the primers pr6/pr8, at the conditions shown above, and sequenced (ABI Prism 3130, Applied Biosystems). The sequence was compared with those in the GenBank database using the Basic Alignment Search Tool (BLAST) available online from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and in the genomes of sequenced fungi from the Fungal Genome Initiative (FGI) (<http://www.broadinstitute.org/science/projects/fungal-genome-initiative/fungal-genome-initiative>) to find homologies. The SCAR marker sequence data were submitted to GenBank under accession number JF304612.

A primer pair, FOX S (forward) and FOX R (reverse), and TaqMan probe, FOX TM, (Table 2) was designed from the SCAR sequence using the LightCyclerTM Probe Design Software 2.0 (Roche Applied Science). Specificity of the primers and probe was evaluated with real-time PCR (LightCyclerTM system, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using different phytopathogens and isolates closely related to *Fusarium* sp.. These samples belonged to the Spanish Type Culture Collection (CECT), the American Type Culture Collection (ATCC), and isolates taken from infected melon plants in greenhouse nurseries (CEBAS collection) (Table 1).

PCR reactions were carried out in triplicates for each fungus in a total volume of 10 µL, containing: 0.3 µM of each primer, 0.025 µM of probe, 1 unit of

Table 2. Primers and probe used in this study for RAPD and real-time PCR

Primer/probe	Sequence	References
Pr1	5'- AGGGGTCTTG- 3'	Castrillo et al., 2003
Pr2	5'- TTCCGCCACC- 3'	Dazoto et al., 2003
Pr3	5'- TCGCCAGCCA- 3'	Dazoto et al., 2003
Pr4	5'- CAGCACCCAG- 3'	Castle et al., 1998
Pr5	5'- AGTCAGCCAC- 3'	Castle et al., 1998
Pr6	5'- GAAACAGCGG- 3'	Schäfer et al., 1992
Pr8	5'- GGAGCCCAC- 3'	Schäfer et al., 1992
Pr14	5'- GCCGTCTACG- 3'	Voigt et al., 1998
FOX S	5'- CGGATAAGGGGATGTCGG- 3'	-
FOX R	5'- GGTGCCATCTGAACCATTAG- 3'	-
FOX TM	5'- 6FAM ^a —AACATTGTCGAGGTCTCAGTTCGATTTCA—BBQ ^b - 3'	-

^a. FAM: 6-carboxyfluorescein. ^b. BBQ: BlackBerryTM Quencher

Premix Ex Taq™ (Takara), 0.5 mM of BSA (bovine serum albumin), 2 μL of DNA template (50–100 ng of fungal DNA) and 0.3 μL of sterile water (Molecular Biology Grade water, AccuGENE). The real-time PCR program was: initial denaturation at 95 °C for 35 s, followed by 35 cycles at 95 °C for 5 s, 64 °C for 15 s and 72 °C for 15 s. The amplification results were analyzed with LightCycler™ Software 4 (Roche Applied Science). The sensitivity of the TaqMan system was assayed by serial dilutions from 1 μg DNA μL^{-1} to 1 pg DNA μL^{-1} extracted from the isolate CEBAS 1014.

The specific band (SCAR marker) was cloned into a pCR 2.1 Vector (Invitrogen) and DHA5 α *E. coli* cells were transformed. Cells containing the plasmid were grown in Luria-Bertani broth (LB) for 24 h in darkness. The plasmid DNA was purified with a QIAprep Miniprep Kit (Qiagen). Presence of the insert was verified with real-time PCR as described above.

A standard curve was obtained by amplification of ten-fold serial dilutions of the linear plasmid containing the specific fragment. The concentration of DNA was measured (NanoDrop, ND-1000, Thermo Fisher scientific Inc.) and related to the known molecular weight of a single plasmid molecule. The concentration was adjusted to 10¹¹ SCAR copies.

2.3. Greenhouse nursery experiment

One melon seed (*Cucumis melo* L. cv. Giotto) was sown in each well of a polystyrene tray with peat used as substrate. Melon seeds were germinated at 25 °C for 72h in darkness. After germination, the polystyrene trays were placed in a greenhouse and muskmelon seedlings were irrigated manually as needed. Twelve days after emerging, 130 melon seedlings were inoculated at the base of the stem with 3 mL of a suspension of 10⁷ conidia mL⁻¹ of *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (CEBAS 1014). One hundred and thirty non-inoculated plants were used as the control. Ten random samples (substrate and plant) were collected 3, 7, 9, 11, 13 and 15 days after inoculation (d.a.i.) prior to the visual detection of Fusarium-wilt symptoms.

2.4. Evaluation of the dynamics of *F. oxysporum* in melon seedlings and substrate by culture-dependent and culture-independent methods

A plate dilution method with Komada selective media (Komada, 1975) was used to determine the *F. oxysporum* population level in the growing substrate (CFU g⁻¹ substrate).

To determine the xylem colonization by the fungus, stem sections were placed on PDA medium (Nash and Snyder, 1962). Stem sections of 5 cm were surface-sterilized with a 1% sodium hypochlorite solution for 5 min, rinsed with sterile water, and dried on sterile filter paper. A disc was cut from the basal part of each stem and placed on PDA.

Plates were incubated at 28 °C for 5 days in darkness. The remaining portion of the stem was stored at –20 °C for subsequent DNA extraction.

The substrate in which each melon plant was grown was homogenized, ground to a powder with liquid nitrogen, and stored at –20 °C. Total genomic DNA was extracted from the substrate (250mg) using the FastDNA SPIN Kit for soil (Q-BIOgene, Inc.) according to the manufacture's protocol with some modifications: samples were homogenised in an oscillating mill for 1 h to ensure total cell lysis; and the SPIN™ Filter was eluted with a greater volume of sterile water to ensure that most of DNA was collected (López-Mondéjar et al., 2010).

Total genomic DNA of vegetative tissue was extracted according to Doyle and Doyle (1987) with some modifications: (i) stem sections were ground to a fine powder with a mortar and pestle in liquid nitrogen and (ii) 50 mg of frozen ground tissue was used to extract the DNA.

The number of specific SCAR marker copies of FOM from the experimental treatment (stem and substrate) was determined with real-time TaqMan PCR using the LightCycler™ Software 4 (Roche Applied Science) by interpolating the cycle threshold with the standard curve. Each run included 3 replicates of the template DNA for each sample, 3 replicates of a 1:5 dilution of the template DNA for each sample, a negative control (sterile water) and an external standard.

2.5. Statistical analysis

CFU data and real time PCR results (SCAR copies) were log-transformed and subjected to analysis of variance (ANOVA). When the F-statistic was significant, Tukey's post hoc test ($P=0.05$) was used to separate means. The statistical software SPSS 15.0 was used for analysis (SPSS Inc.).

3. Results

3.1. Development of a specific SCAR marker and a TaqMan-PCR system for *F. oxysporum*

Strains of *Fusarium* sp. (Table 1) were subjected to RAPD-PCR with random oligonucleotides (Table 2). One primer pair (pr6/pr8) produced polymorphic and distinguishable band patterns ranging from 300bp to 1500bp (data not shown) with one specific band being present in all *F. oxysporum* f. sp. *melonis* strains (CECT 20474, CEBAS 1013, CEBAS 1014, CEBAS 1015, CEBAS 1016, CEBAS 1017, CEBAS 1018, and CEBAS 1019). The specific band corresponded to a 650-bp sequence, which showed homology with sequences of the genome of *F. oxysporum* in FGI and no homology with sequences in GenBank. Based on this sequence, a pair of primers (FOX S/FOX R) and a TaqMan probe (FOX TM) were designed (Table 2) to amplify a 230 bp

fragment. The sensitivity of the system was tested by 10 fold dilutions from $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ DNA to $1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$, obtaining a detection limit of $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$. Specificity of the primers was tested by the TaqMan-PCR system for DNA from all isolates in Table 1. The expected amplicon was obtained from all isolates of *F. oxysporum*. No amplification was present in the remaining assayed fungi.

A standard curve for the plasmid DNA with an insert was achieved by real-time PCR assays, plotting the cycle thresholds against the logarithm of the initial number of target copies. 10^{11} SCAR copies were calculated, starting with an initial concentration of $270.9 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. A standard curve ranging over nine orders of magnitude had a range of quantification from 10^{10} to 10^2 SCAR copies μL^{-1} , with an efficiency of 2.02. The external standard used for sample quantification was 10^6 SCAR copies μL^{-1} .

Table 3. Number of FOM infected melon plants (n=10) prior to visual detection of Fusarium-wilt symptoms at 15 days after inoculation by culture media (PDA) and TaqMan PCR system.

Days after Inoculation (d.a.i.)	Number of infected plants	
	TaqMan PCR system	PDA
3	1	1
7	3	2
9	2	2
11	3	2
13	6	3
15	6	6

3.2. Monitoring of *F. oxysporum* dynamic in melon seedlings and substrates with SCAR-based real-time TaqMan PCR

The number of SCAR marker copies per gram of substrate assessed by the TaqMan PCR system was compared to the population density assessed by the soil plate technique (Fig. 1). The level of *F. oxysporum* (CFUs g^{-1} substrate) was constant throughout the fifteen d.a.i. with a mean value of $\log 6.28$ (CFUs g^{-1} substrate). Analysis by the TaqMan PCR system showed a similar behavior, with the quantity of SCAR copies detected throughout the fifteen d.a.i. corresponding to a mean value of $\log 4.50$ (SCAR copies g^{-1} substrate).

The detection of *F. oxysporum* in melon seedling stems with PDA showed that the incidence of *F. oxysporum* increased over the course of the study (Table 3). Similar behavior was shown by the TaqMan PCR system. However, this system showed higher sensitivity than PDA, due to the ability to detect *F. oxysporum* in seedling stems where no growth in PDA was found (Table 3). The results of pathogen quantification in plant tissues showed a low number of SCAR copies amplified (<100). These data were used for *F. oxysporum* detection but could not be used for an accurate quantification of FOM due to

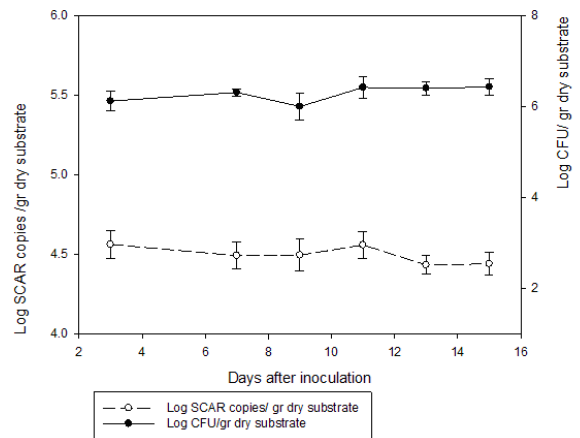


Fig. 1. Assessment of *F. oxysporum* population over time in substrate using culture plating (continuous line with black dots), and the real-time TaqMan PCR system (non-continuous line with white dots). Bars represent the standard deviation of the mean.

the level falling below the range of quantification of the standard curve.

4. Discussion

In order to avoid serious economic losses due to failed crops, the rapid and reliable detection of pathogens is important in formulating strategies for disease management in greenhouse nurseries. In contrast to classical methods based on morphological observations, molecular techniques are faster and have a higher specificity and sensitivity (Schena et al., 2004).

A SCAR marker for *F. oxysporum* was successfully identified and amplified by real-time TaqMan PCR to monitor the population dynamics of *F. oxysporum* in peat and melon seedlings. SCAR markers derived from a RAPD have been widely-used for different *formae speciales* of *F. oxysporum* (Jiménez-Gascó and Jiménez-Díaz, 2003; Pasquali et al., 2006; Lievens et al., 2008). Due to the low variability in housekeeping sequences, such as elongation factors, β -tubuline and the ITS ribosomal region, *Fusarium* sp. can also be subjected to such an analysis (McCartney et al., 2003).

Markers to identify *formae speciales* are suitable approaches, because they are directly linked to characteristics of pathogenicity (Lievens and Thomma, 2005). Virulence of a plant pathogen is usually attributed to either nucleotide differences in homologous genes (Joosten et al., 1994) or to the unique presence of a gene or set of genes that confer a specific trait to the pathogen, such as the production of host-specific toxins (Friesen et al., 2006). However, the genetic basis of host specificity in *F. oxysporum* still remains unknown (Di Pietro et al., 2003). It is known that some *formae speciales*

have broader host ranges (Lievens et al., 2008), and that more than one *forma specialis* may occur in a given host (Baayen, 2000) such as *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* and *F. oxysporum* f. sp. *melonis* in melon plants (Vakalounakis et al., 2005). Moreover, even non-pathogenic isolates of *F. oxysporum*, that are almost exclusively found in natural suppressive soils (Fravel et al., 2002), are defined as strains for which no host plant have been identified (Lievens et al., 2008). Therefore, the detection of potential pathogenic isolates present in substrates, seeds and/or materials would enhance the fast response to remove the source of contamination.

Several studies have been recently published that detect and quantify the presence of isolates of *F. oxysporum* (Zhang et al., 2005; Jiménez-Fernández et al., 2010; Lin et al., 2010; Validov et al., 2011). However, most of these studies present limitations pertaining to the development of molecular diagnostics at the *formae speciales* level (Validov et al., 2011; Jiménez-Fernández et al., 2010). It is due to the polyphyletic feature of the majority of the *formae speciales*, that make the development of PCR primers at the *forma specialis* level difficult (Baayen, 2000).

However, in this experiment, the TaqMan PCR system was able to detect the fungus at the species level (*F. oxysporum*). Use of this system would allow for the monitoring of different *formae speciales* of *F. oxysporum* within growing substrates, which are commonly used for several species of horticultural plant and can contain different pathogen isolates of *Fusarium* spp. (Al-Sadi et al., 2011) and *F. oxysporum* (Waller et al., 2008), under greenhouse nursery conditions.

In this experiment, the designed real-time TaqMan PCR system was used to provide a more accurate picture of the development of *F. oxysporum* populations in melon seedlings compared to the traditional plate culture technique (Lievens et al., 2008). The population of *F. oxysporum* in the substrate and in the melon seedling stem was monitored until Fusarium wilt symptoms were visually detected (15 d.a.i.). The pathogen population exhibited similar patterns in both the substrate and plant material throughout the experiment.

It is not possible to compare the real-time TaqMan PCR values to the number of *F. oxysporum* propagates (Wilson, 1997). PCR amplifies DNA from both non-viable and viable propagates. Therefore, quantification is more closely related to the number of fungal nuclei per gram of substrate than to the number of viable propagates, which may lead to overestimation (Atkins et al., 2003). The extraction of RNA combined with real-time PCR quantification would provide a more meaningful assessment of cellular viability. Further work will be necessary to develop the protocols for this process.

Both methods showed that the *F. oxysporum* population in the substrate was constant throughout the experiment. These results are in accordance with

other studies which show that spores of *F. oxysporum* remain in the substrate long-term (Suárez-Estrella et al., 2004), allowing for plant infection at any time point during the growth cycle (Lin et al., 2010). However, with the TaqMan PCR system, we detected the presence of the pathogen in less than 48 hours after inoculation, versus 5-6 days after inoculation with the culture-dependent technique. This TaqMan PCR system would allow for farmers and greenhouse nurseries to ensure the transplantation of plants and substrate which are free of *F. oxysporum*. This would avoid further dispersal of the pathogen and reduce field contamination, which would otherwise lead to crop loss in future growing seasons (James et al., 1991).

After inoculation, *F. oxysporum* quantification in the stem of melon plants showed SCAR marker levels of fewer than 100 copies (the lowest value able to be quantified with the standard curve). This could be due to a low quantity of fungus within the vascular system at the initial stage of infection, which would correspond to low *F. oxysporum* DNA copies. Furthermore, a low quantity of fungal DNA combined with the difficulty of extracting DNA from fungi (Fredricks et al., 2005) could lead to an insufficient sample for proper quantification. Additionally, the presence of phenolic compounds and polysaccharides in the vegetative tissues can bind with proteins and DNA, decreasing the quality of the extracted material and reducing the efficiency of the PCR (Wilson, 1997). A higher frequency of the sequence of interest within the genome would provide a greater number of copies, allowing for a more accurate quantification than with a SCAR region that only appears once (Cordier et al., 2007). Even with these potentials for interference, the high sensitivity of the real-time PCR system allowed for the detection of low quantities of the pathogen in the plant tissue at early stages of infection; a critical time point for which traditional culture techniques have proven to be much less sensitive.

In conclusion, the real-time TaqMan PCR system based on a SCAR marker permits sensitive and rapid detection of *formae speciales* of *F. oxysporum* in plant material and substrate; as soon as 2 days after infection. Use of the traditional plate culture method requires 5-6 days post-infection for detection of the pathogen. This new system provides an effective - monitoring technique, which could alert greenhouse nurseries and farmers to the presence of the fungal pathogen and allow for the quicker removal and replacement of infected crops. This system would also ensure that plants and substrates are free of *F. oxysporum* before transplantation and would reduce pathogen propagation in the field. The implementation of this system would be advantageous to those industries impacted by *F. oxysporum* infection and could help curb the economic losses caused by failed melon crops.

Acknowledgements

This work was supported by the I3P Programme from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain. The stay of Robert Beaulieu at CEBAS-CSIC was funded by the Fulbright Program in Spain.

References

- Al-Sadi, A. M., Al-Said, F. A., Al-Jabri, A. H., Al-Mahmooli, I. H., Al-Hinai, A. H. & de Cock, A. W. A. M. (2011). Occurrence and characterization of fungi and oomycetes transmitted via potting mixtures and organic manures. *Crop Protection*, 30, 38-44.
- Atkins, S. D., Clark, I. M., Sosnowska, D., Hirsch, P. R., & Kerry, B. R. (2003). Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real-time PCR, selective media and baiting. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4788-4793.
- Baayen, R. P. (2000). Diagnosis and detection of host-specific forms of *Fusarium oxysporum*. *EPPO Bulletin*, 30, 489-491.
- Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D., & Bisset, J. (1998). Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American Mushrooms Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 133-137.
- Castriello, L. A., Vandenberg, J. D., & Wraight, S.P. (2003). Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region marker. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82, 75-83.
- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M. I., Steinberg, C., & Alabouvette, C. (2002). use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 467-476.
- Cordier, C., Edel-Ilerrmann, V., Martin-Laurent, F., Blal, B., Steinberg, C., & Alabouvette, C. (2007). SCAR-based real-time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 60-68.
- Dalzoto, P. R., Glienke-Blanco, C., Kava-Cordeiro, V., Araujo, W. L., & Azevedo, J. L. (2003). RAPD analyses of recombination processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*, 107, 1069-1074.
- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4, 315-326.
- Doyle, J. J., & Doyle J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Filion, M., St-Arnaud, M., & Jabaji-Hare, S. H. (2003). Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 67-76.
- Fravel, D., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2002). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157, 493-502.
- Fredricks, D. N., Smith, C., & Meier, A. (2005). Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5122-5128.
- Friesen, T. L., Stukenbrock, E. H., Liu, Z., Meinhardt, S., Ling, H., & Faris, J.D. (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*, 38, 953-956.
- Gómez, J., & Tello, J.C. (2000). Presencia de la raza 1-2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* en Almería. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 26, 27-33.
- James, R. L., Dumroese, R. K., & Wenny, D. L. (1991). *Fusarium* disease of conifer seedlings. In J. R. Sutherland, & S. G. Glover (Eds.), *Proceedings of the first meeting of IUFRO Working Party S2.07-09 (Diseases and Insects in Forest Nurseries)*. Forestry Canada, Pacific and Yukon Region. Information Report BC-X-331, p 181-190.
- Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Díaz, R. M., & Landa, B. B. (2010). Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. *Applied Soil Ecology*, 46, 372-382.
- Jiménez-Gascó, M. M., & Jiménez-Díaz, R. M. (2003). Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5 and 6. *Phytopathology*, 93, 200-209.
- Joosten, M. H. A. J., Cozijnsen, T. J., & de Wit, P. J. G. M. (1994). Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature*, 367, 384-386.
- Komada, H. (1975). Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research*, 8, 114-125.
- Lievens, B., Rep, M., & Thomma, B. P. H. J. (2008). Recent development in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science*, 64, 781-788.
- Lievens, B., & Thomma, B. P. H. J. (2005). Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant pathogens and use in practice. *Phytopathology*, 95, 1374-1380.
- Lin, Y. H., Chen, K. S., Chang, J. Y., Wan, Y. L., Hsu, C. C., Huang, J. W., & Chang, P. F. L. (2010). Development of the molecular methods for rapid detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in Taiwan. *New Biotechnology*, 27, 409-418.

Capítulo 3

- López-Mondéjar, R., Antón, A., Raidl, S., Ros, M., & Pascual, J. A. (2010). Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass. *Bioresource Technology*, 110, 2888-2891.
- McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., & Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, 59, 129-12.
- Nash, S., & Snyder, W. C. (1962). Quantitative estimations by plate count of propagules of the bean root *Fusarium* in field soil. *Phytopathology*, 52, 567-572.
- Pasquali, M., Piatti, P., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2006). Development of a Real-time Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from Basil Seed and Roots. *Journal of Phytopathology*, 154, 632-636.
- Pavliou, G. C., & Vakalounakis, D. J. (2005). Biological control of root and stem rot of greenhouse cucumber, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, by lettuce soil amendment. *Crop Protection*, 24, 135-140.
- Reuveni, D., Raviv, M., Krasnovsky, A., Freiman, L., Medina, S., Bar, A., & Orion, D. (2002). Compost induces protection against *Fusarium oxysporum* in sweet basil. *Crop Protection*, 21, 583-587.
- Sant, D., Casanova, E., Segarra, G., Avilés, M., Reis, M., & Trillas, M. I. (2010). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on *Fusarium wilt* and water usage in carnation grown on compost-based growth medium. *Biological Control*, 53, 291-296.
- Schäfer, C., & Wöstemeyer, J. (1992). Random-primer-dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptophaeria maculans*). *Journal of Phytopathology*, 136, 124-136.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., & Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 893-908.
- Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., & Moreno, J. (2004). Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* on plant waste. *Crop Protection*, 23, 127-133.
- Vakalounakis, D. J., Doulis A. G., & Klironomou, E. (2005). Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* attacking melon under natural conditions in Greece. *Plant Pathology*, 54, 339-346.
- Validov, S. Z., Kamilova, F. D., & Lugtenberg, B. J. J. (2011). Monitoring of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strains during tomato plant infection. *Microbial Biotechnology*, 4, 82-88.
- Voigt, K., Schleier, S., & Wöstemeyer, J. (1998). RAPD-based molecular probes for the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*): Evidences for pathogenicity group-specific sequences in the fungal genomes. *Journal of Phytopathology*, 146, 567-576.
- Waller, P., Thornton, C. R., Farley, D., & Groenhof, A. C. (2008). Pathogens and other fungi in growing media constituents. *Acta Horticulturae*, 779, 361-365.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 3741-3751.
- Zhang, Z., Zhang, J., Wang, Y., & Zheng, X. (2005). Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. *FEMS Microbiological Letters*, 248, 39-47.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

VI. Capítulo cuarto

Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent.

Expresión de genes relacionados con el micoparasitismo en aislados de *Trichoderma harzianum* para evaluar su eficacia como agentes de control biológico.

Resumen

La selección de nuevos aislados de *Trichoderma harzianum* que presenten una elevada actividad supresiva frente *Fusarium oxysporum* es una de las estrategias empleadas para evitar el aumento de fungicidas químicos. En este estudio, se seleccionaron cinco aislados de *T. harzianum* (T-30, T-31, T-32, T-57 y T-78) sobre 31 aislados del género *Trichoderma* analizados mediante RAPD-PCR. La expresión de los genes que codifican para la actividad NAGasa (*exc1* y *exc2*), quitinasa (*chit42* y *chit33*), proteasa (*prb1*) y β -glucanasa (*bgn13.1*), así como sus respectivas actividades enzimáticas fueron medidas. Además, se realizaron enfrentamientos duales en placa de los diferentes aislados seleccionados frente a *F. oxysporum*. Los diferentes perfiles de expresión de genes de los diferentes aislados fueron analizados y se relacionaron con los valores de actividad enzimática y con las observaciones en placa. En base a los estudios realizados, los aislados T-30 y T-78 mostraron el mayor potencial micoparasítico frente a *F. oxysporum*, lo cual puede contribuir a mejorar el control biológico de este fitopatógeno.

*Este artículo ha sido publicado en la revista **Biological Control** (2011) 56 (1), 59-66*

Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent

Rubén López-Mondéjar*, Margarita Ros, José Antonio Pascual

Department of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), P.O. Box 164, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

ABSTRACT

The selection of new isolates of *Trichoderma harzianum* with high suppressive activity against *Fusarium oxysporum* is a suitable strategy to avoid the increase of chemical pesticides. In this study, 31 isolates of *Trichoderma* sp. were analyzed by RAPD-PCR and five isolates of *T. harzianum* (T-30, T-31, T-32, T-57 and T-78) were selected. The expression of genes encoding for NAGases (*exc1* and *exc2*), chitinases (*chit42* and *chit33*), proteases (*prb1*) and β -glucanases (*bgn13.1*) activities and their respective in vitro enzymatic activities were measured. Dual plate confrontation assays of the isolates against *F. oxysporum* were also tested. Different profiles of gene expression between the different *T. harzianum* isolates were related to enzymatic activities values and dual plate confrontation. In this work, the *T. harzianum* isolates T-30 and T-78 showed the greatest mycoparasitic potential against *F. oxysporum*, which could lead to improved biocontrol of this phytopathogen.

Keywords: biocontrol, *Fusarium oxysporum*, hydrolytic enzymes, mycoparasitism, qRT-PCR, *Trichoderma harzianum*

1. Introduction

The intensive use of fungicides in agriculture results in the accumulation of toxic compounds, which is potentially dangerous for humans and the environment in general (Cook and Baker, 1983), and in the resistance of pathogens to these fungicides (Dekker and Georgopolous, 1982). The use of biological control agents (BCAs) is a promising alternative to chemical products (Alabouvette et al., 2006). *Trichoderma harzianum* is a mycoparasite used extensively as a BCA of phytopathogenic fungi (Chet, 1987). The mechanisms involved in the control of phytopathogens by *Trichoderma* species include antibiosis (Howell, 2003) and mycoparasitism (Hjeljord and Tronsmo, 1998).

The complex process of mycoparasitism involves different steps, such as recognition of the host, attack and subsequent penetration and killing. During this process *Trichoderma* secretes hydrolytic enzymes that hydrolyze the cell wall of the host fungus (Kubicek et al., 2001; Woo et al., 2006; Verma

et al., 2007), consisting of chitin and β -glucan fibers embedded in a protein matrix. Therefore, the main mechanism of antagonism of *T. harzianum* against pathogenic fungi is the extracellular secretion of chitinases, β -1,3-glucanases and proteases (Elad et al., 1982; Geremia, 1993).

The chitinolytic enzymes are divided into *N*-acetylglucosaminidases (EC 3.2.1.52) and chitinases (EC 3.2.1.14), depending on the manner in which they hydrolyze chitin (Seidl, 2008). The chitinolytic system of *T. harzianum* contains from five to seven enzymes (Haran et al., 1996), of which the action of two endochitinases (CHIT42 and CHIT33) (Gokul et al., 2000) and two *N*-acetyl- β -D-glucosaminidases (EXC1 and EXC2) (Seidl et al., 2006) have been studied. The expression of these enzymes is induced in the presence of cell walls, colloidal chitin or carbon starvation, and is repressed by glucose (Silva et al., 2004). The β -1,3-glucanases are classified as exo- (EC 3.2.1.58) and endo-glucanases (EC 3.2.1.6, EC 3.2.1.39), and hydrolyse the glucose residues from the β -glucans that occur in the cell wall of pathogenic fungi (Benítez et al., 1998). The most important glucanase secreted by *T. harzianum* (BGN13.1) acts as an endoglucanase: its expression is induced by fungal cell wall and laminarin and is repressed by glucose (De la Cruz et al., 1995).

The proteolytic activity of *T. harzianum* is a prerequisite for the lysis of the protein matrix of the

* Corresponding author. Tel.: +34 96839 6397; fax: +34 96839 6213.

E-mail address: rlmondejar@cebas.csic.es (R. López-Mondéjar).

doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.10.003

pathogen cell wall, and for inactivation of the hydrolytic enzymes secreted by the pathogen, which decreases its pathogenicity (Markovich and Kononova, 2003). The alkaline protease PRB1 produced by *T. harzianum* (EC 3.4.21.-) is encoded by the *prb1* gene. This gene is induced when the fungus grows in media containing cell walls of *Rhizoctonia solani*, mycelium or chitin as the sole source of carbon. Production of PRB1 is inhibited by glucose (Geremia et al., 1993).

The mycoparasitic capacity of the genus *Trichoderma* varies depending on the species or isolate, with *T. harzianum* having a high efficiency as a mycoparasite (Markovich and Kononova, 2003). Isolates of *T. harzianum* with a high potential for the secretion of hydrolytic enzymes can be obtained through the transformation of the fungus by multiple copies of these genes (García et al., 1994). However, such transformations techniques are not available to all laboratories. The creation of transformants is not always easy and low transformation rates of the fungi often result (Ruiz-Díez, 2002). Moreover, the insertion of genes which encode lytic enzymes can affect the production of antibiotics and other enzymes also involved in the mycoparasitism, as well as the growth rate and colonization properties of the BCA (Flores et al., 1997). One alternative to transformation is the use of *T. harzianum* isolates obtained naturally from different sources such as compost and/or agricultural soils (Rincón et al., 2008). Study of the mycoparasitic capacity of such isolates allows the selection of those which over-express the genes of interest.

The objective of this work was to study the mycoparasitic capacity of different natural isolates of *T. harzianum* which were characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990), which separate the different isolates in similar groups, favoring the elimination of duplicated isolates (Samson, 1995). Five isolates were selected and used for determination of their hydrolytic enzyme activities, the relative expression of the genes that encode these enzymes, by quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction (qRT-PCR), and their effects on the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, the causal agent of melon vascular Fusarium wilt, by dual-plate confrontation assay.

Table 1
RAPD-PCR primers and real time PCR primers used in this study.

Technique	Primer	Sequence (5'-3')
RAPD-PCR	pr3	TCGCCAGCCA
Real time PCR	exc1-RT-fw	CGCGGTGTGAGGTCATTA
	exc1-RT-rv	CCTGTGTGTGTGATGGA
	exc2-RT-fw	AATACCTCAAGCCTCTGAAC
	exc2-RT-rv	CTCATCGGAATCGAAACA
	chit42-RT-fw	CTGGGAGTACCCTCGAGA
	chit42-RT-rv	CGCAGCTTGGAGTAGTTATC
	chit33-RT-fw	AATCCGGAAGCTCTGTIC
	chit33-RT-rv	GGGAAGAAGCACTGAGG
	prb1-RT-fw	GTCTGAGGAACCTATTGGTGG
	prb1-RT-rv	TCCCTGGAAGACCTTAACG
	b13glu-RT-fw	TCTCCAAGACTCTGAGATTCAACA
	b13glu-RT-rv	ACCAAGTTCTTAATAGTACGG
	tef-fw	GGTACTGGTGTGAGTTCGAGGCTG
	tef-rv	GGGCTCGATGGAGTCGATAG

2. Materials and methods

2.1 Fungal strains

Thirty-one *Trichoderma* isolates were collected and cultivated in potato dextrose agar (PDA) (Scharlau, Spain; 39 g L⁻¹). The strains were isolated from different sources: agricultural soil (T-20, T-22, T-23, T-24, T-28, T-29, T-36, T-37, T-38, T-40, T-42, T-43, T-44, T-46, T-78), green compost (T-50, T-54, T-55, T-57), peat (T-32), commercial products (T-30, T-31) and the Spanish Culture Type Collection (CECT 2926, CECT 2930, CECT 2413, CECT 20105, CECT 20513, CECT 2424, CECT 2937, CECT 20107, CECT 20103).

The phytopathogen *F. oxysporum* f. sp. *melonis* was isolated from infected melon plants from a greenhouse nursery in Murcia, Spain, and cultivated in PDA.

2.2 Preparation of fungal mycelium, DNA extraction and RAPD-PCR analysis

The isolates were grown for 48 h in PDA plates covered with cellophane. Mycelium was collected and ground in liquid nitrogen, with a mortar and pestle. The DNA extraction was carried out with phenol and chloroform, followed by isopropanol precipitation according to Hartl and Seiboth (2005). The total DNA extracted was checked in 1% agarose gel for electrophoresis with 1x Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer, and the DNA concentration was measured with Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

The DNA extracted from isolates was amplified with the random amplified polymorphic (RAPD) technique, using the primer pr3 (Table 1). Amplification was carried out in a Takara PCR Thermal Cycler, in a volume of 25 µL containing: 200 ng of fungal DNA, 2.5 µL of reaction buffer (Biotools, Spain), 1.5 µM of MgCl₂ (Biotools, Spain), 0.4 µM of each primer, 0.5 U of Taq polymerase (Biotools, Spain) and sterile water (Molecular Biology Grade Water, AccuGENE). The amplification conditions were as described by Yu and Pauls (1992): an initial denaturation step of 5 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 5 s at 94 °C, 30 s at 36 °C and 60 s at 72 °C, and a final extension step of 5 min at 72 °C.

Twenty microliters of product were loaded in a 1.5% agarose gel for electrophoresis with 1x TAE buffer, followed by staining with ethidium bromide. The bands were visualized under UV light and the band sizes were estimated with the molecular size marker EcoLadder II (Ecogen, Spain).

Analysis of RAPD (Fig.1A) was performed with the Quantity One program (Bio-Rad). The Dice similarity coefficient (Dice, 1945) was determined for the resulting DNA band profiles, and the clustering algorithm of Ward (1963) was used to calculate the dendrogram (Fig. 1B).

One isolate of each group was selected and the internal transcribed spacers and 5.8S gene were sequenced (ITS1, 5.8 S and ITS 2) with ITS 1/ITS 4 primers (White et al., 1990). The sequences were analyzed with the TrichOKey 2 program, for the molecular identification of *Hypocrea/Trichoderma* at the genus and species levels (Druzhinina et al., 2005).

2.3 Fungal cultivation conditions for enzyme production

The *Trichoderma* isolates were grown in minimal medium consisting of (g/L): KH_2PO_4 , 2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4; $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.002; and 0.05% peptone plus 0.1% cell walls of *F. oxysporum*, to active the expression of mycoparasitism-related genes, or 0.1% glucose, to check the normal growth of all the isolates in shaken flask cultures (control).

Each treatment consisted of 150 mL of the above-mentioned growth medium inoculated with 1 mL containing 10^6 conidia of each isolate, incubated on a rotary shaker at 220 rpm in darkness at 28 °C: 40 mL samples of each culture were taken at 24 and 48 h. These were filtered through Miracloth (Calbiochem, Germany), washed with sterile water and the mycelia were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for RNA extraction. Each treatment was performed three times.

For production of *F. oxysporum* cell walls, *F. oxysporum* was grown in potato dextrose broth (PDB, Scharlau) in a rotary shaker, for 10 days at 28 °C and 230 rpm. The mycelium was then harvested in Miracloth, washed with sterile water, lyophilized and crushed into powder in liquid nitrogen using a mortar and pestle. The powder was suspended in sterile water, sonicated four times for 1 min on ice and washed by centrifugation for 10 min at 13,000g, at 4 °C. The cell walls were lyophilized and stored at -80 °C.

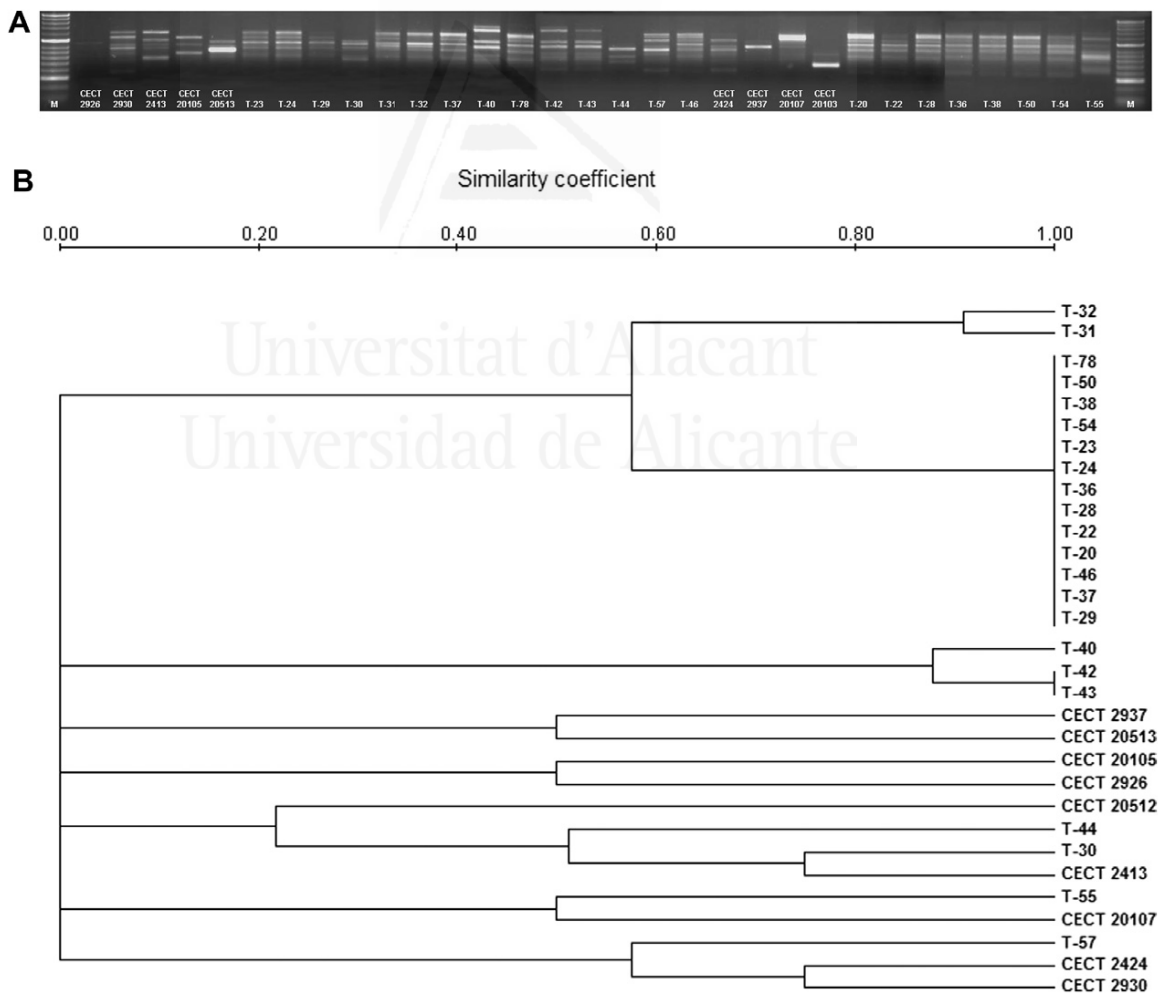


Fig. 1. (A) RAPD patterns of different isolates of *Trichoderma* generated by primer pr3 (M: 2000bp marker); and (B) cluster analysis of different *Trichoderma* isolates.

2.4. Enzyme assays

Samples from shaken flask cultures were centrifuged at 13,000g, at 4 °C for 10 min, and the supernatants were used for measurements of extracellular enzyme activity. The total (extracellular and cell-wall-bound) enzyme activities from shaken flask cultures were measured using samples containing mycelia, without centrifugation.

2.4.1. *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase activity (NAGase)/chitinase activity

The NAGase activity was measured using a modification of the method described by Yagi et al. (1989) based on the release of *p*-nitrophenol from the respective aryl chitosides. Fifteen microliters of sample were added to 75 μ L of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.7), with 300 μ g mL⁻¹ 4-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosamine (Sigma) as substrate. The samples were incubated at 50 °C with agitation, and the reaction was stopped after 15 min by addition of 60 μ L of 0.4 M Na₂CO₃. The absorbance was measured at 405 nm in a microplate reader (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). Control measurements were performed by omitting the substrate from the phosphate buffer. Enzyme activity was measured using a standard curve of *p*-nitrophenol (0–2.5 mg/L). Chitinase activities were determined using the same protocol as above, but with the substrate 4-nitrophenyl- β -D-*N,N,N'*-triacetylchitotriose (Sigma). The activities were measured as nkat and normalized with the biomass values (nKat/ μ g protein). One kat was defined as the amount of enzyme that released one μ mol of *p*-nitrophenol per minute under the specified conditions.

2.4.2. Protease activity

Protease activity was measured using a modification of the method described by Ladd and Butler (1972), based on colorimetric detection through the Folin reaction of the peptides released. One milliliter of sample was added to 2.5 mL of 1% casein solution in 0.1 M Tris HCl (pH 8.1). The samples were incubated at 52 °C with gentle agitation, and the reaction was stopped after 5 h by addition of 1 mL of 17.5% trichloroacetic acid; the samples were then vortex-homogenized and centrifuged for 8 min at 3,400 g. The supernatant was collected for color development. One milliliter of the supernatant was added to 7 mL of 3.7% Na₂CO₃ and 1 mL of 0.06% CuSO₄ and incubated at room temperature for 30 min. After this, 1 mL of Folin–Ciocalteu's phenol reagent was added. The samples were incubated again for 30 min at room temperature, and the absorbance was measured at 578 nm. Control measurements were carried out with the addition of substrate after the first incubation. Enzyme activities were calculated using a standard curve of tyrosine (0–140 mg/L). Activity was measured as nkat and normalised with the biomass values (nKat/ μ g protein).

2.4.3. β -1,3-glucanase activity

Seven hundred microliters of sample were added to 200 μ L of 1% laminarin (Sigma) in 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 5.5). The samples were incubated for 30 min at 40 °C, with agitation. Control measurements were obtained with the addition of substrate after incubation. The enzyme activity was determined according to Somogyi (1952) and Nelson (1944), estimating the quantity of free reducing groups liberated. One hundred microliters from the incubated samples were mixed with 100 μ L of Somogyi reagent and incubated at 100 °C for 15 min. The samples were cooled on ice before the addition of 100 μ L of Nelson reagent, and distilled water to 1.5 mL. The samples were centrifuged for 3 min at 10,000g, and the absorbance was measured at 540 nm. Enzyme activities were calculated using a standard curve of glucose (0.01–0.4 g/L); they were measured as nkat and normalized with the biomass values (nKat/ μ g protein).

2.5. Biomass measures

One milliliter of sample from each flask culture was lysed by the addition of 0.2 mL of 0.1 M NaOH, followed by agitation for 3 h at 30 °C. The samples were centrifuged for 10 min at 13,000g and the supernatant was used to measure total protein concentration, corresponding to the biomass. Four hundred microliters of sample were mixed with 400 μ L of distilled water and 200 μ L of Bio-Rad protein assay (Bio-Rad), and incubated for 5 min at room temperature. Absorbance was measured at 595 nm. The total protein concentration was calculated using a standard curve of bovine serum albumin (BSA).

2.6. Quantification of hydrolytic enzymes by real-time RT-PCR (qRT-PCR)

The RNA was extracted from the mycelia according to Chomczynski and Sacchi (1987) and was measured with NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

One microgram of RNA was treated with DNase (Sigma) according to the manufacturer's protocol, and the absence of DNA was checked by real-time PCR. The cDNA was synthesized with oligodT using the ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen), following the procedure described by the manufacturer.

For the relative expression of each gene, 2 μ L of a 1:5 diluted sample of cDNA were added to a total reaction volume of 10 μ L: 5 μ L of Quantimix EASY SYB (Biotools, Spain), 0.375 μ M of each primer, 0.5 mg/mL of BSA and DEPC–water. The LightCycler System (Roche) was used for PCR amplification with the following program: a denaturation step of 30 s at 95 °C, followed by 45 cycles of 5 s at 95 °C, 25 s at 60 °C and 1 s at 82 °C, and a final step to obtain the

melting curves of the amplicons: 0 s at 95 °C, 10 s at 65 °C and 0 s at 95 °C. As a housekeeping gene control for RT-PCR, the eukaryotic elongation factor 1-alpha gene was used.

The relative expression level of the genes was measured with the Relative Quantification-Monocolor of the Amplification Analyses section of the LightCycler Software 4.0 (Roche). Primers were designed to target the exon region of each gene (Table 1) with LightCycler Probe Design 2 (Roche).

2.7. *In vitro* assay of fungal isolates against *F. oxysporum*

Discs of 0.5-cm diameter from each isolate were placed in PDA plates at 4 cm of a disc of *F. oxysporum*, according to Whipps (1987). The discs were collected from a previous culture in PDA. The discs of the pathogen were placed in the Petri dishes 3 days before the *Trichoderma* isolates, due to the high growth rate of *Trichoderma* species. The plates were incubated at 28 °C for 7 days. The mycoparasitic effect was defined as the capacity of the *Trichoderma* isolate to grow on top of *F. oxysporum*.

2.8. Statistical analysis

The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, USA). The statistical significance of the results was determined by the Tukey test ($P < 0.05$).

3. Results

3.1 RAPD profiles and selection of isolates

The DNA of the different isolates was amplified by RAPD-PCR using the primer pr3 (Fig. 1A). Cluster analysis of the profiles of the isolates showed 18 different band patterns with a similarity < 0.99 (Fig. 1B). One isolate representative of each profile was selected, sequenced (ITS 1/ITS 4) and identified (TrichOKey 2 program). Four different species of *Trichoderma* were detected: *T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. ghanense* and *T. harzianum*. Five isolates of *T. harzianum* were selected for the rest of the experiments.

3.2. *In vitro* assay of the effect of the fungal isolates against *F. oxysporum*

The five selected isolates of *T. harzianum* were confronted in plates with *F. oxysporum*. After 7 days, the isolates T-30, T-31, T-32 and T-78 showed overgrowth on the pathogen to differing degrees, exhibiting sporulation on the pathogen. The greatest growth was observed for isolates T-30 and T-78,

followed by T-31 and T-32. The isolate T-57 did not show overgrowth on the pathogen (Data not shown).

3.3. Screening of *T. harzianum* isolates for enzyme production

The five isolates of *T. harzianum* grown in liquid cultures with cell walls of *F. oxysporum* showed activity for all the hydrolytic enzymes assayed (Fig. 2). The enzymatic activities of the isolates grown in minimal medium with glucose as carbon source were very low (data not shown).

The values of hydrolytic enzyme activity (NAGase, chitinase, protease and β -1,3-glucanase) were higher in the total activity, which includes the extracellular activity of excreted enzymes and the activity of cell wall-bound enzymes of the fungus.

3.3.1. *N-acetylglucosaminidase/chitinases activities*

The isolates T-30 and T-78 showed NAGase activities in the extracellular fraction which were up to 6- and 5-times higher, respectively, than for isolate T-57 (ANOVA, $F = 123.867$, $P < 0.05$) (Fig 2A). However, the highest values of total activity occurred for T-78 and T-32 (ANOVA, $F = 732.203$, $P < 0.05$) (Fig 2B). The activity increased exponentially for the five isolates, which showed their highest values 48 h after inoculation of the medium (ANOVA, $F = 1232.881$, $P < 0.05$).

The chitinase activity, both extracellular (ANOVA, $F = 54,169$, $P < 0.05$) and total (ANOVA, $F = 545.342$, $P < 0.05$), was higher in the isolates T-30 and T-78 (Fig. 2C and D). The chitinase activity was detected at 24 h, with similar values for all the isolates. However, only isolates T-78 and T-30 had greater chitinase activity (between 4- and 5-times higher than the others) at 48 h. The rest of the isolates showed similar values of chitinase activity at 24 and 48 h.

3.3.2. Protease activity

The isolate T-57 showed a higher protease activity (up to 4-times more extracellular activity) than the others, that showed similar activity (ANOVA, $F = 664.871$, $P < 0.05$; $F = 1609.082$, $P < 0.05$) (Fig. 2E and 2F). This isolate showed an exponential increase of protease activity at 24 h, reducing the sharp of this increase at 48 h (ANOVA, $F = 718.767$, $P < 0.05$; $F = 1366.386$, $P < 0.05$). However, the protease activity increased linearly in the rest of the isolates.

3.3.3. β -1,3-glucanase activity

The β -1,3-glucanase activity was detected mainly at 48 h, since the values after 24 h of incubation were very low (ANOVA, $F = 713.959$, $P < 0.05$; $F = 916.789$, $P < 0.05$). The isolate T-30 (with an extracellular activity 10-times higher than that of T-57) and the isolate T-78 (with approximately 4-times greater activity than T-57) (ANOVA, $F = 126.495$, $P < 0.05$) showed the highest values of β -glucanase

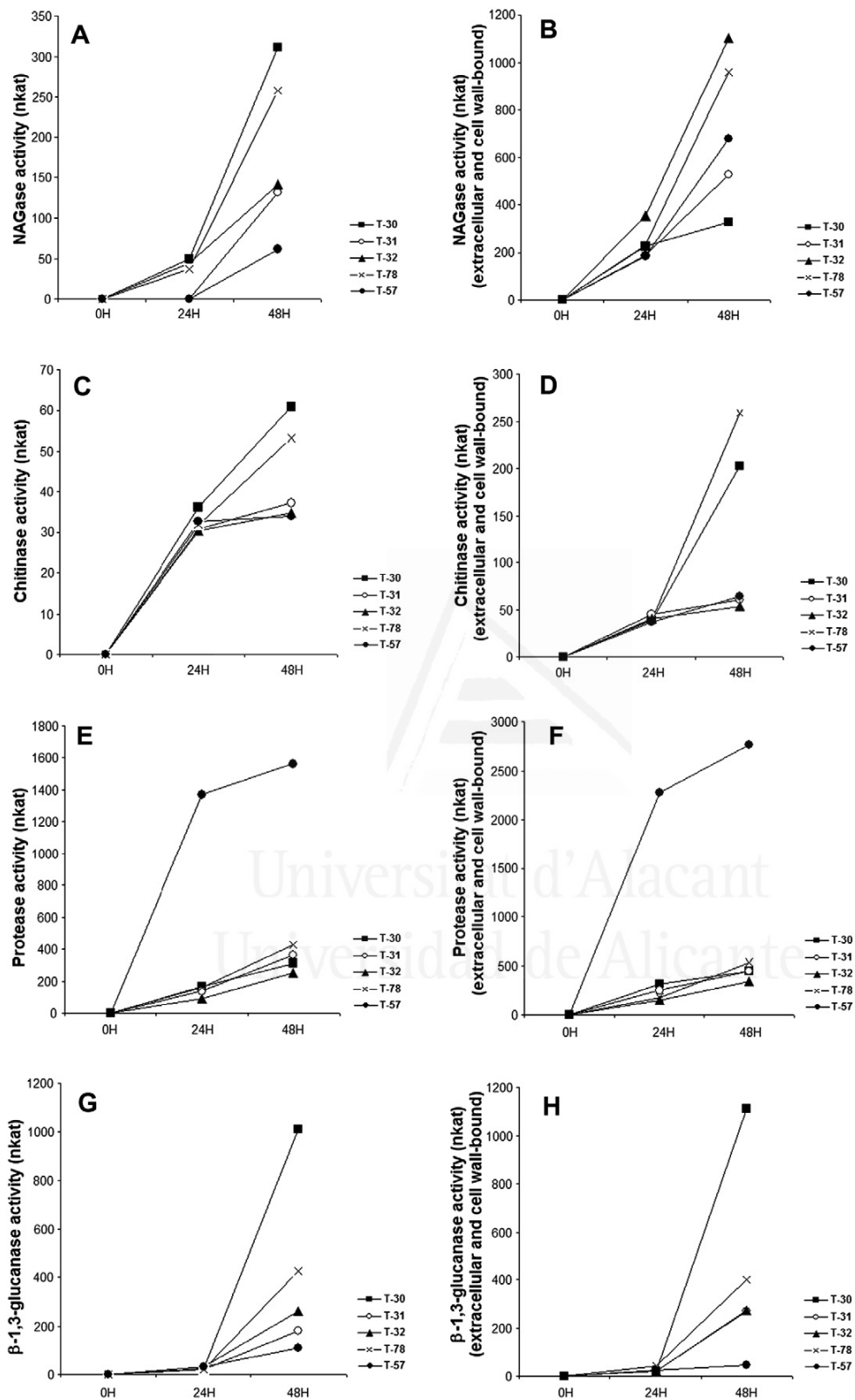


Fig. 2. Hydrolytic enzyme activities involved in mycoparasitism of different *T. harzianum* isolates growth on flask cultures. (A) Extracellular NAGase activities, (B) total (extracellular and cell wall-bound) NAGase activities, (C) extracellular chitinase activities, (D) total (extracellular and cell wall-bound) chitinase activities, (E) extracellular protease activities, (F) total (extracellular and cell wall-bound) protease activities, (G) extracellular β -1,3-glucanase activities, and (H) total (extracellular and cell wall-bound) β -1,3-glucanase activities. The activities were normalized with the biomass (nKat/ μ g protein).

activity, with an exponential increase at 48 h (Fig. 2 G and 2 H). The total activity was similar to the extracellular activity (ANOVA, $F = 181.411$, $P < 0.05$).

Therefore, in relation to the extracellular hydrolytic activity, the isolates with higher mycoparasitic capacity were T-30 and T-78, since they showed the highest NAGase, chitinase and β -1,3-glucanase activities. On the other hand, isolates T-31 and T-57 showed low activity in general, although T-57 had the highest protease activity.

3.4. Relative expression of genes involved in mycoparasitism

The mRNA synthesized by the different isolates after 48 h of incubation in the medium was studied. The mRNA was retrotranscribed to cDNA with oligodTs. The cDNA was quantified with real time PCR, and the values for each isolate were normalized with the expression levels of the eukaryotic translation elongation factor 1- α . The expression levels studied correspond to the genes *exc1* and *exc2* (encoding NAGase activity), *chit42* and *chit33* (chitinase activity), *prb1* (protease activity) and *bgn13.1* (β -1,3-glucanase activity) (Fig. 3).

The *exc1* gene was expressed by all the isolates, isolate T-30 showed the highest expression followed by T-32 and T-57. The lowest expression was exhibited by T-78 (Fig. 3A). The expression levels of the *exc2* gene were lower for the five isolates (Fig. 3B), T-31 and T-78 showed the highest expression. No *exc2* expression was detected for isolate T-57.

The expression values of the *chit42* gene for the five isolates were higher than for *chit33* (Fig. 3 C and D). The isolate T-78 showed the highest expression level for both genes, relative to the other isolates. Whereas the isolate T-57 showed expression for the *chit42* gene, no expression was detected for *chit33* (Fig. 3C and D).

The highest expression values for the *prb1* gene were for the isolate T-31, followed by T-78, whilst isolate T-57 did not express *prb1* (Fig. 3E).

The expression of the *bgn13.1* gene was not high. The isolate T-30 showed higher values than the rest of the isolates (Fig. 3F).

4. Discussion

The fungus *T. harzianum* is one of the biological control agents (BCAs) most widely used in agriculture as an alternative to synthetic chemical products (Chet, 1987). Isolates of this fungus have been employed against a wide spectrum of phytopathogenic fungi, including *F. oxysporum*, responsible for Fusarium wilt in melon plants (Bernal-Vicente et al., 2009). Improvements in the control achieved with this BCA have been based on the use of isolates possessing greater efficacy, characterized by greater adaptability and persistence in the medium

to which it is applied and/or greater aggressiveness against a particular phytopathogen (Rincón et al., 2008). Such isolates are characterized mainly by the secretion of hydrolytic enzymes such as chitinases, glucanases and proteases – capable of hydrolyzing the cell wall of the phytopathogenic fungi (Markovich and Kononova, 2003; Seidl et al., 2006; Verma et al., 2007; Rincón et al., 2008).

Analysis of the cluster profiles of the bands obtained through RAPD-PCR of the different isolates of the genus *Trichoderma* and their subsequent sequencing allowed us to identify various species of *Trichoderma* (*T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. ghanense* and *T. harzianum*), as well as five different isolates of *T. harzianum*. This analysis also revealed the wide genetic variation among the five isolates of *T. harzianum*; the origin of this is unknown but it could have originated in the processes of recombination that occur during the sexual phase of reproduction (Sharma et al., 2009). When confronted in plate culture with the pathogenic fungus *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, the growth of the five selected isolates of *T. harzianum* was considerably more rapid than that of the pathogen, an important point for the survival of the BCA in the medium (Samuels, 1996). In the plates, the greatest mycoparasitic effect was observed for the isolates T-30 and T-78; this was in accord with total and extracellular hydrolytic enzyme activities (NAGases, chitinase and β -1-3 glucanase) that were greater than for the other isolates tested.

The activity of NAGase has been studied deeply in *T. atroviride*; it is encoded by only two genes (*nag1* and *nag2*). Similar patterns are expected in the other *Trichoderma* species: *exc1* and *exc2* in *T. harzianum*, *exc1y* and *exc2y* in *T. asperellum*, and *tv-nag1* and *tv-nag2* in *T. virens* (Seidl et al., 2006). Both genes encode enzymes which are important in the chitin metabolism of the mycoparasite (Haran et al., 1996). However, López-Mondéjar et al. (2009) observed that, for a line of *T. atroviride* that is double knockout for these two genes, the lack of these enzymes did not affect the mycoparasitic capacity against *R. solani* and *Botrytis cinerea*. Other research has indicated the role of these genes in the activation of other chitinases, acting as signals to indicate that the process of cell wall degradation has commenced (Ramot et al., 2004). The oligosaccharides liberated by the breakdown of the glucans of the cell wall (much more accessible than chitin) would activate the expression of the NAGases (Seidl et al., 2006), allowing the fungus to detect the presence of a host cell wall containing chitin. This crucial function for the mycoparasitism activation would explain the expression of the gene *exc1* (to a greater or lesser extent) in all the isolates examined, unlike other genes such as *chit33* and *prb1* that are only expressed in some isolates. The high NAGase activity observed for the isolates T-30 and T-78 corresponded with the levels of expression of the gene *exc1* for T-30 but not for T-78. The high NAGase activity of the isolate T-78 may be due to a higher expression of

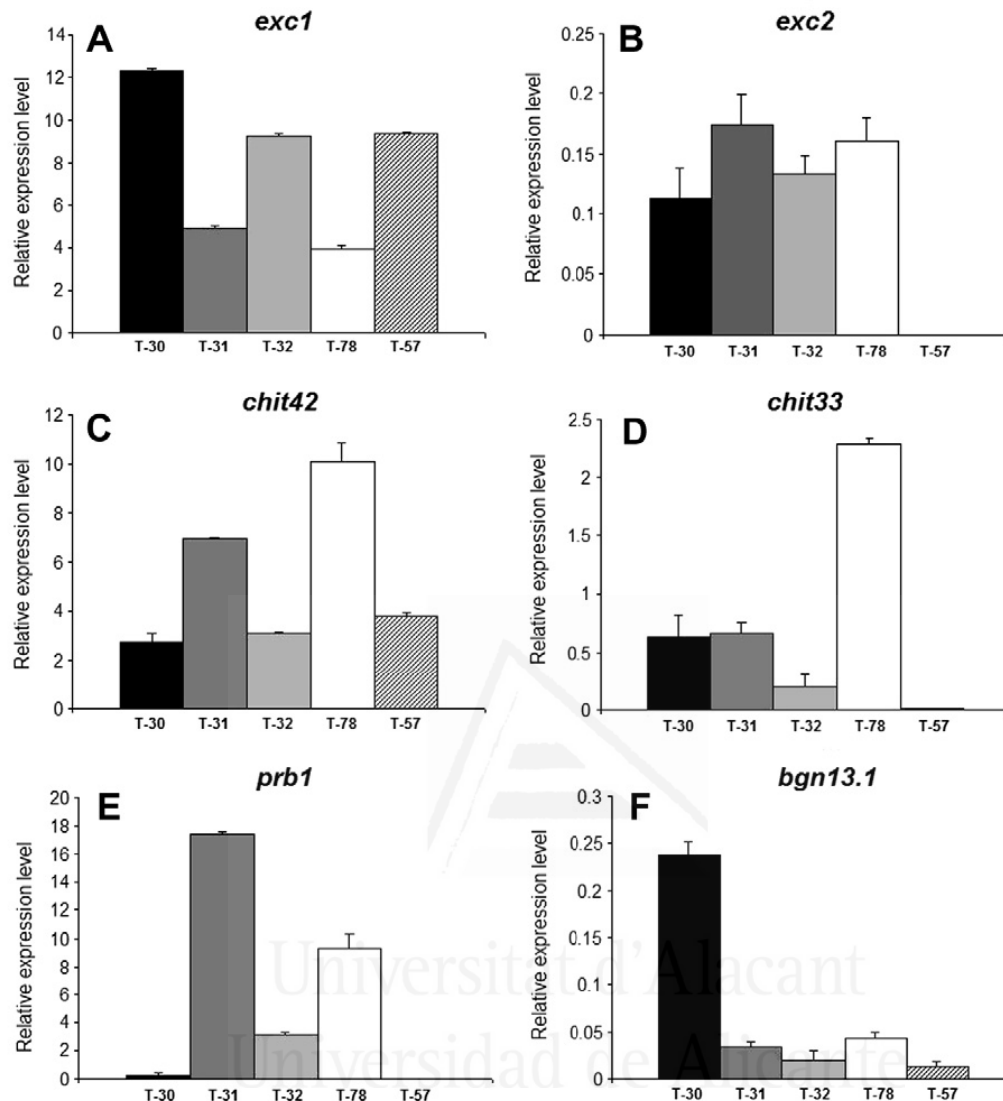


Fig. 3. Relative expression of different genes involved in the mycoparasitism of different isolates of *T. harzianum* after growth for 48 h with cell walls of *F. oxysporum*: *exc1* (A), *exc2* (B), *chit42* (C), *chit33* (D), *prb1* (E), and *bgn13.1* (F). The data were normalized with the expression of the control gene *tef1*.

exc1 over previous hours before sampling. Except for T-57, the gene *exc2* was also expressed in all the isolates, although to a lesser extent than *exc1*. This could have influenced the degree of mycoparasitism exhibited by the isolate T-57, which was very low compared with the others. López-Mondéjar et al. (2009) observed that in *T. atroviride* the expression of one of these genes can compensate for the absence of the NAGase activity encoded by the other; this may explain the difference in expression level between the two genes observed in the present study.

De la Cruz et al. (1992) related total chitinase activity in *T. harzianum* with the expression of at least

three different chitinases encoded by the genes *chit42*, *chit33* and *chit37*. In the current work, we analysed the expression levels of *chit42* and *chit33*, that code for two chitinases (CHIT42 and CHIT33) which play an important role in the mycoparasitic activity of *T. harzianum* (García et al., 1994). There is only a single copy of both of these genes in the *T. harzianum* genome: their expression is activated by the presence of fungal mycelium, cell walls or spores and is inhibited by the presence of glucose in the medium (García et al., 1994), as we have shown in our assay. The gene *chit42* is present in many isolates of *Trichoderma*, both mycoparasitic and non-mycoparasitic (Limón et al., 1995). It is for this reason

that this enzyme would be involved in the process of cell wall morphogenesis. However, greater chitinolytic activity was seen in parasitic isolates than in non-parasitic ones (García et al., 1994), thus connecting this activity with mycoparasitism. The enzyme encoded by the gene *chit33* appears not to be associated with the process of morphogenesis, since its role seems to be that of a saprophytic or mycoparasitic enzyme (Limón et al., 1995). The two chitinases, CHIT42 and CHIT33, are regulated independently: *chit42* is induced by chitin and *chit33* is de-repressed in the absence of glucose (Limón et al., 1995). The high chitinase activity of isolate T-78, both total and extracellular, could be linked to the levels of expression of the genes *chit42* and *chit33*, since both were highest for this isolate. The isolate T-30, however, showed high chitinase activity but not elevated levels of expression of either gene encoding chitinolytic activity. This would indicate the presence of other chitinases, in addition to those encoded by *chit42* and *chit33*.

CHIT42 is one of the main chitinolytic enzymes synthesized (Zeilinger et al., 1999); perhaps this gene had been expressed to a greater degree hours earlier, whereas the sampling at 48 h reported other chitinases not encoded by *chit42* or *chit33*.

The greatest protease activity was exhibited by the isolate T-57. This high activity could act to break down the other enzymes secreted by this isolate, thereby lowering their activity (Flores et al., 1997). However, this activity was not correlated with a greater expression of the gene *prb1*, since its expression was not detected for this isolate. This result may be obtained due to this activity is not encoded by the alkaline protease gene *prb1*, but rather by the expression of genes that encode other proteases (Delgado-Jarana et al., 2002). The low activities of all the hydrolytic enzymes except protease for this isolate, together with the low expression levels of the studied genes, could explain its lack of mycoparasitism against *F. oxysporum* in the plate culture.

The isolate T-30, followed by T-78, exhibited the greatest activity of β -1,3-glucanase; these values corresponded with the expression level of the gene *bgn13.1* for T-30, which showed the highest value. The level expression of this gene for the isolate T-78 was slightly higher than the rest of isolates. Unlike the other genes, *bgn13.1* was expressed in all the isolates, encoding one β -1,3-glucanase (De la Cruz et al., 1995). This pattern of expression, common among all the isolates, derives from the importance of this enzyme in the degradation of the fungal cell wall, which is composed of β -glucan fibrils (Markovich and Kononova, 2003). In this work, all the β -1,3-glucanase activity was extracellular, since the values were similar to the total activity. This corroborates previous experiments which indicated that this enzyme is excreted and plays a direct role in the process of mycoparasitism (De la Cruz et al., 1995).

This work shows that a large battery of hydrolytic enzymes is synthesized by *T. harzianum* when

growing in the presence of *F. oxysporum* cell walls. Hence, there is a coordinated induction of chitinases, β -1,3-glucanases and proteases in *T. harzianum* when in contact with a phytopathogen (De la Cruz et al., 1995). This synergic activity against other fungi is of great ecological relevance (Lorito et al., 1994), since it permits the fungus to assimilate carbon via alternative means during carbon starvation (Steyart et al., 2004).

In conclusion, this work showed that the genes implicated in the mycoparasitism of the different isolates of *T. harzianum*, at both the enzymatic and molecular levels, permitted the characterization of the mycoparasitic capacity of the selected *Trichoderma* isolates against *F. oxysporum*. It has been demonstrated that the isolates T-78 and T-30 possess promising mycoparasitic activity against *F. oxysporum* and they could be used in agricultural situations to reduce infection by this pathogen and hence improve crop quality, while avoiding the need to generate mutants.

Acknowledgment

This work was supported by the I3P Programme from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain.

References

- Alabouvette, C., Olivain, C., Steinberg, C., 2006. Biological control plant diseases: the European situation. *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 329-341.
- Cook, R.J., Baker, K.F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minnesota.* 539 pp.
- Benítez, T., Limón, C., Delgado-Jarana, J., Rey, M., 1998. Glucanolytic and other enzymes and their genes, in: Harman, G., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 185-204.
- Bernal-Vicente, A., Ros, M., Pascual, J.A., 2009. Increased effectiveness of the *Trichoderma harzianum* isolate T-78 against Fusarium wilt on melon plants under nursery conditions. *J. Sci. Food Agric.* 89, 827-833.
- Chet, I., 1987. *Trichoderma*: Application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi, in: Chet I. (Eds), *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, John Wiley and Sons, New York, pp. 137-160.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analy. Biochem.* 162, 156-159.
- De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benítez, T., Pintor-Toro, Llobell, J.A., 1992. Isolation and characterization of three chitinases

- from *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Biochem. 206, 859-867.
- De la Cruz, J., Pintor-Toro, J.A., Benítez, T., Llobell, A., Roero, L.A., 1995. Novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. J. Bacteriol. 177, 6937-6945.
- Dekker, J., Georgopolous, S.G., 1982. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen: Pudoc, pp. 265.
- Delgado-Jarana, J., Rincón, A.M., Benítez, T., 2002. Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. Microbiol. 148, 1305-1315.
- Dice, L.R., 1945. Measures of the amount of ecological association between species. J. Ecol. 26, 297-302.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komoj, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, C.P., 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fun. Genet. Biol. 42, 813-828.
- Elad, Y., Chet, I., Henis, Y., 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol. 28, 719-725.
- Flores, A., Chet, I., Herrera-Estrella, A., 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. Curr. Genet. 31, 30-37.
- García, I., Lora, J.M., De la Cruz, J., Benítez, T., Llobell, A., Pintor-Toro, J.A., 1994. Cloning and characterization of a chitinase (CHIT42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Curr. Genet. 27, 83-89.
- Geremia, R.A., Goldman, G.H., Jacobs, D., Aviles, W., Vila, S.B., Van Montagu, M., Herrera-Estrella, A., 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Mol. Microbiol. 8, 603-613.
- Gokul, B., Lee, J.H., Song, K.B., Rhee, S.K., Kim, C.H., Panda, T., 2000. Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum* – A review. Bioproc. Engin. 23, 691-694.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I., 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. Phytopathol. 86, 980-985.
- Hartl, L., Seiboth, B., 2005. Sequential gene deletions in *Hypocrea jecorina* using a single blaster cassette. Curr. Genet. 48, 204-211.
- Hjeljord, L., Tronsmo, A., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview, in: Harman, G., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 185-204.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87, 4-10.
- Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Lorito, M., 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. J. Plant Pathol. 83, 11-24.
- Ladd, J.N., Butler, J.H.A., 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using protein and dipeptide derivatives as substrates. Soil Biol. Biochem. 4, 19-30.
- Limón, M.C., Lora, J.M., García, I., De la Cruz, J., Llobell, A., Benítez, T., Pintor-Toro, J.A., 1995. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Curr. Genet. 28, 478-483.
- López-Mondéjar, R., Catalano, V., Kubicek, C.P., Seidl, V., 2009. The β -N-acetylglucosaminidases NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma atroviride* on chitin. FEBS J. 276, 5137-5148.
- Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A., Woo, S.L., Harman, G.E., 1994. Purification, Characterization, and Synergistic Activity of a Glucan 1,3- β -Glucosidase and an N-Acetyl- β -Glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Mol. Plant Pathol. 84, 398-405.
- Markovich, N.A., Kononova, G.L., 2003. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. App. Biochem Microbiol. 39, 389-400.
- Nelson, N.J., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380.
- Ramot, O., Viterbo, A., Friesem, D., Oppenheim, A., Chet, I., 2004. Regulation of two homodimer hexosaminidases in the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* by glucosamine. Curr. Genet. 45, 205-213.
- Rincón, A.M., Codón, A.C., Benítez, T., 2008. Hidrolasas y genes fúngicos de interés en biocontrol, in: Pallás, V., Escobar, C., Rodríguez Palenzuela, P., Marcos, J.F. (Eds.), Herramientas biotecnológicas en fitopatología. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 345-368.
- Ruiz-Díez, B., 2002. Strategies for the transformation of filamentous fungi. J. Appl. Microbiol. 92, 189-195.
- Samuels, G.J., 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol. Res. 100, 923-935.
- Samson, R.A., 1995. Constraints associated with taxonomy of biocontrol fungi. Can. J. Bot. 73, S83-S88.
- Seidl, V., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., 2006. A screening system for carbon sources enhancing β -N-acetylglucosaminidase formation in *Hypocrea atroviridis* (*Trichoderma atroviride*). Microbiology 152, 2003-2012.
- Seidl, V., 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. Fungal Biol. Rev. 22, 36-42.
- Sharma, K., Mishra, A.K., Misra, P.S., 2009. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates

- for their efficacy as biocontrol agents. *J. Phytopathol.* 157, 51-56.
- Silva, R.N., da Silva, S.P., Brandão, R.L., Ulhoa, C.J., 2004. Regulation of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*: evidence that cAMP controls its expression. *Res. Microbiol.* 155, 667-671.
- Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19-23.
- Steyaert, J.M., Stewart, A., Jaspers, M., Carpenter, M., Ridgway, H.J., 2004. Co-expression of two genes, a chitinase (*chit42*) and a proteinase (*prb1*), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. *Mycology* 96, 1245-1252.
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valéro, J.R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Engin. J.* 37, 1-20.
- Ward, J.H., 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58, 236-244.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acid. Res.* 18, 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* 18, 6531-6535.
- Whipps, J.M., 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytol.* 107, 127-142.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., San Diego, CA, pp. 315-322.
- Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M., 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96, 181-185.
- Yagi, T., Hisada, R., Shibata, H., 1989. 3,4-Dinitrophenyl *N*-acetyl-beta-D-glucosaminide, a synthetic substrate for direct spectrophotometric assay of *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase or *N*-acetyl-beta-D-hexosaminidase. *Anal. Biochem.* 183, 245-249.
- Yu, K., Pauls, K.P., 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl. Acid. Res.* 20, 2606.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Prayer, K., Woo, S.L., Mach, R.L., Fekete, C., Lorito, M., Kubicek, C.P., 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fun. Genet. Biol.* 26, 131-140.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

VII. Capítulo quinto

Evaluation of chitin-rich residues on chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *in vitro* and greenhouse nursery experiments.

Evaluación de residuos ricos en quitina en la actividad quitinolítica de *Trichoderma harzianum*: experimentos *in vitro* y en semillero.

Resumen

Los residuos ricos en quitina obtenidos en diversas industrias, presentan numerosas aplicaciones en campos tan diversos como la biotecnología, la farmacología, la medicina o la agricultura. En este estudio se evaluaron tres residuos ricos en quitina para mejorar la actividad del hongo micoparasítico *Trichoderma harzianum*, empleado como agente de control biológico (ACB) de *Fusarium oxysporum* en semilleros. Tanto el quitosano (CHIT) como la harina de camarón (SSP) y los restos de champiñón (MW) activaron la expresión de los genes que codifican para la actividad NAGasa y quitinasa de *T. harzianum* (*exc1*, *exc2*, *chit42*, *chit33* y *chit37*), mostrando los MW la mayor actividad en condiciones *in vitro*. Bajo condiciones de semillero, los tratamientos que incluyeron estos residuos y que además fueron inoculados con *T. harzianum*, mostraron las mayores actividades NAGasa y quitinasa en el sustrato, manteniendo los valores de peso seco en las plantas inoculadas con *F. oxysporum*. Además, la incorporación de estos residuos al sustrato mejoró el crecimiento de las plántulas de melón (longitud de la primera hoja, longitud del tallo y peso seco). El uso de estos residuos junto a *T. harzianum* como complemento de los medios de cultivo de plántulas en semillero mejora el crecimiento de las plántulas de melón y reduce la pérdida de peso debida al patógeno, obteniéndose de esta forma un valor añadido para estos residuos, mejorando su manejo.

Este trabajo se encuentra en revisión.

Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *in vitro* and greenhouse nursery experiments

Rubén López-Mondéjar*, Pepa Blaya, Margarita Ros, José Antonio Pascual

Department of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), P.O. Box 164, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

ABSTRACT

The chitin-rich residues obtained from several industries have numerous applications in diverse fields such as biotechnology, pharmacology, medicine and agriculture. In this study, three different chitin-rich residues were evaluated with regard to enhancement of the chitinolytic activity of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*, used for biological control of *Fusarium oxysporum* in greenhouse nurseries. Chitosan (CHIT), shrimp shell powder (SSP) and mushroom wastes (MW) activated the expression of the *T. harzianum* genes encoding the NAGase and chitinase activities (*exc1*, *exc2*, *chit42*, *chit33* and *chit37*), the highest *in vitro* activities of *T. harzianum* being seen with MW. Under greenhouse nursery conditions, the treatments involving amendment with these residues and with *T. harzianum* increased the NAGase and chitinase activities of the growing media and maintained the shoot dry weight of plants infected with *F. oxysporum*. Moreover, the incorporation of these residues into the growing media enhanced the growth (first leaf length, stem length and shoot dry weight) of muskmelon seedlings. The use of these residues with *T. harzianum* as amendments of growing media enhanced the growth of muskmelon seedlings and decreased the weight loss due to the pathogen, giving an added-value to these residues and enhancing their management.

Keywords: chitinolytic activity, chitosan, growing media, mushroom wastes, shrimp shell powder, *Trichoderma harzianum*

1. Introduction

The use of specific microorganisms (biological control agents, BCAs) that interfere with plant pathogens and pests is a nature-friendly, ecological approach to overcome the problems caused by standard chemical methods of plant protection, which are not always effective for some diseases (Viterbo et al., 2002). One of the most-used BCAs in agriculture is the fungus *Trichoderma harzianum*, which has shown good results against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Bernal-Vicente et al., 2009).

The beneficial effect of *Trichoderma* is due to a complex of different mechanisms such as: direct mycoparasitism, antibiotic production, nutrient and space competition, enhancement of plant resistance to pathogens and systemic induced or acquired plant resistance (Harman, 2004; Vinale et al., 2008).

The mycoparasitism process allows the penetration of the host mycelium, by secretion of a complex group of extracellular hydrolytic enzymes that include proteases, glucanases and chitinases (Viterbo et al., 2002). The latter have been reported to be a key factor in this process (Verma et al., 2007).

T. harzianum expresses from five to seven different chitinolytic enzymes (Haran et al., 1996), classified as endochitinases (CHIT42, CHIT33 and CHIT37) (Gokul et al., 2000, Huang and Yang, 2008) and *N*-acetyl-glucosaminidases (EXC1 and EXC2) (Seidl et al., 2006). The two types of enzyme differ in their chitin cleavage patterns: endochitinases (EC 3.2.1.14) belong to glycoside hydrolase (GH) families 18 and 19 and catalyse the hydrolysis of β -1,4 linkages in chitin, while *N*-acetylglucosaminidases (EC 3.2.1.52) belong to GH family 20 and hydrolyse the terminal *N*-acetylglucosamine residues (Seidl, 2008). These enzymes are encoded by genes whose expression is activated by the presence of chitin or the products of its degradation (Viterbo et al., 2002). Therefore, the use of chitin-rich compounds can enhance the fungal chitinolytic system.

Chitin is the second-most-abundant polymer in the biosphere after cellulose; it is found in the

* Corresponding author. Tel.: +34 96839 6397; fax: +34 96839 6213.
E-mail address: rlmondejar@cebas.csic.es (R. López-Mondéjar).

exoskeletons of crustaceans and insects and in the cell walls of most fungi (Seidl, 2008). There are several industries that produce materials rich in chitin as waste, the seafood industry being the most important (Palma-Guerrero et al., 2008). Purified chitin can be obtained by the demineralisation and deproteinisation of crustacean shells and squid bones. In some cases, the chitin is deacetylated to obtain a soluble form of chitin, known as chitosan. Other sources of these compounds rich in chitin are the fungal-based waste materials accumulated in the mushroom production and fermentation industries, where no demineralisation treatment is required due to the low levels of inorganic materials in fungal mycelia (Wu et al., 2005). All these residues are non-toxic, biodegradable, biocompatible with plant and animal tissues and exhibit unique properties that allow their use in multiple fields such as cosmetics, food processing, water engineering, biotechnology, pharmacology and medicine (Kumar, 2000; Dutta et al., 2004). In agriculture, chitin and its derivatives, such as chitosan and oligomers, have been shown to act as potent agents that elicit defence reactions in plants and inhibit the growth of pathogenic fungi and bacteria (Shibuya and Minami, 2001).

However, there is little work focused on the potential of these chitin-rich residues as activators of the chitinolytic activity of *T. harzianum*.

The objective of this work was to study the effect of three different chitin residues, one purified chitin source (chitosan, France Chitine) and two non-purified chitin sources (shrimp shell powder and mushroom wastes), on the chitinolytic activity of the BCA *T. harzianum*. For this purpose, *in vitro* and greenhouse nursery experimental approaches were used: the *in vitro* assay was carried out by studying the relative expression of *T. harzianum* genes that encode for different chitinolytic activities described in the literature. The response was followed by measuring chitinase and *N*-acetylglucosaminidase activities in a pure culture of *T. harzianum* supplemented with the different chitin sources, in comparison with glucose. The *in vivo* assay was carried out at the greenhouse nursery level, where melon seedlings were grown in growing media amended with *T. harzianum* and the different chitin

sources, evaluating chitinolytic activities and the plant response to different chitin sources and their interaction with *T. harzianum* during crop infection with the pathogen *Fusarium oxysporum*.

2. Material and Methods

2.1. Chitin sources

Three different sources of chitin were used: purified chitosan (France Chitine), shrimp shell powder and mushroom wastes (*Agaricus bisporus*). The main chemical characteristics of these compounds are described in Table 1. The percentage of chitin in each source was calculated according to De Boer et al. (1999), measuring chitin richness as the glucosamine content. The carbon and nitrogen contents were determined using a LECO TRUSPEC CN carbon/nitrogen analyzer. The rest of the nutrients were determined by digestion with HNO₃ and H₂O₂, using a Milestone Ethos 1 microwave, followed by analysis by ICP (ICAP 6500 Duo Thermo).

2.2 Fungal inoculums

The *T. harzianum* isolate T-78 (Th T-78) (CECT 20714, Spanish Type Culture Collection) was grown on potato dextrose agar (PDA) (Scharlau, Spain), previously autoclaved at 121 °C for 20 min and amended with 100 mg L⁻¹ sterilised streptomycin, and incubated at 28 °C for 7 days.

The pathogen *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) was isolated from melon plants showing disease symptoms, using the method of Nash and Snyder (1962). Conidia of FOM were produced by growing three discs (5 mm diameter) of 7-day-old mycelia grown on PDA (Scharlau, Spain), autoclaved at 121 °C for 20 min and amended with 100 mg L⁻¹ sterilised streptomycin, in 250 mL of potato dextrose broth (PDB) (Scharlau, Spain), autoclaved at 121 °C for 20 min. The culture was maintained at 28 °C in a rotary shaker at 150 rpm for 8 days, to achieve a final concentration of 10⁸ conidia/mL. The conidia were

Table 1. Composition of the three chitin-rich residues used in our study. (*): percentage of chitin was measured as glucosamine content.

	Chitosan	Shrimp shell powder	Mushroom wastes
Chitin* (mg/g)	503.98	106.37	57.75
Total C (%)	44.50	41.65	40.44
Total N (%)	6.28	8.79	5.84
Total K (%)	0.01	0.28	3.25
Total P (%)	0.05	1.81	0.97
Total Ca (%)	0.13	6.04	0.08
Total Mg (%)	0.07	0.39	0.10
Total Na (%)	0.47	0.38	0.02

recovered by centrifugation (6000 g, 20 min), rinsed twice with sterile, distilled water and filtered through 101 quartz wool (Panreac, Spain). The concentration was determined with a haemocytometer and the conidia diluted to the desired concentration.

2.3. In vitro assay

One mL containing 10^6 conidia of *T. harzianum* T-78 (Th T-78) was grown in 150 mL of minimal medium (g/L): KH_2PO_4 , 2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4; $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.002; and 0.05% peptone, with different 0.1% chitin sources as the sole carbon source: chitosan (CHIT); shrimp shell powder (SSP); and mushroom wastes (MW). Glucose (GLU) was used as the control to check the normal growth of the isolate. The fungal cultures were maintained in darkness at 28 °C, in a rotatory shaker at 220 rpm, for 72 h. Forty millilitres of each culture were sampled at 24, 48 and 72 h, filtered through Miracloth (Calbiochem, Germany) and washed with sterile water. The mycelia were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for RNA extraction.

2.3.1. Enzyme activities

Chitinase and *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminidase (NAGase) activities were measured as described by López-Mondéjar et al. (2011). The total activities were measured in samples containing mycelium and the extracellular activities in the supernatant of centrifuged samples (13,000 g at 4 °C, for 10 min). The activities were measured as nkat and normalised with the biomass values (nkat/ μ g protein). The biomass was measured using 1-mL samples from each flask culture, according to López-Mondéjar et al. (2011).

2.3.2 RNA isolation, cDNA synthesis and qRT-PCR

The RNA was isolated from frozen mycelia as described by Chomczynski and Sacchi (1987), and its concentration and quality were measured with NanoDrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific). One microgram of RNA was treated with DNase (Sigma) following the procedure described by the manufacturer. The cDNA was synthesised with oligodT using the ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. The relative expression of each gene was measured using the LightCycler System (Roche), and each run with a total volume of 10 μ L included: 2 μ L of a 1:5 diluted sample of cDNA, 5 μ L of Quantimix EASY SYB (Biotools, Spain), 0.375 μ M of each primer, 0.5 mg/mL of bovine serum albumin (BSA) and DEPC-water. The amplification conditions were: a denaturation step of 30 s at 95 °C, followed by 45 cycles of 5 s at 95 °C, 25 s at 60 °C and 1 s at 82 °C, and a final step to obtain the melting curves of the amplicons: 0 s at 95 °C, 10 s at 65 °C and 0 s at 95 °C. The eukaryotic elongation 1-alpha gene (*tef*) and

the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gadph*) were used as housekeeping gene controls for RT-PCR. The data were analysed with LightCycler Software 4.0 (Roche). Primers sequences for the *chit42*, *chit33*, *exc1*, *exc2* and *tef* genes were obtained from López-Mondéjar et al. (2011). The primers for *chit37* and *gadph* were designed with LightCycler Probe Design 2 (Roche): *chit37*-RT-fw (5'-TCATCTCGACTATCGTCCC-3'), *chit37*-RT-rv (5'-TCTGTGCAAGGACACCAT-3'), *gadph*-RT-fw (5'-GAGACTGGCGCCGACTA-3') and *gadph*-RT-rv (5'-GATGACATCGGCAGAGC-3').

2.4. Greenhouse nursery experiment

Peat was used as the growing medium for cultivating muskmelon seedlings in a greenhouse nursery. The peat was sterilised twice at 121 °C for 20 min (waiting 24 h between each sterilisation). The treatments assayed were: Peat inoculated with Th T-78 ($5 \cdot 10^6$ conidia g^{-1} growing medium) and amended with 1% chitosan (P+CHIT+Th T-78); 1% of shrimp shell powder (P+SSP+Th T-78); or 1% of mushroom wastes (P+MW+Th T-78); with non-amended peat as a control (P+Th T-78). All the treatments were also assayed without inoculation of Th T-78: peat amended with 1% chitosan (P+CHIT); 1% of shrimp shell powder (P+SSP); or 1% of mushroom wastes (P+MW); and non-amended peat (P).

Muskmelon (*Cucumis melo* L. cv. Giotto) seeds were sown on the different growing media assayed as treatments, with a cover of vermiculite, in polystyrene trays, one seed per well. The experiment was established in a randomised design with 30 replicates of each treatment that were inoculated with FOM ($5 \cdot 10^5$ conidia g^{-1} growing medium) 14 days after sowing (DAS); another 30 plants were not inoculated and were used as the control.

Germination took place in a growth chamber at 25 ± 1 °C, over 72 h. Then, the trays were placed, in a randomised manner, on rails in a greenhouse with natural daylight conditions. The plants were irrigated daily and were harvested 45 days after sowing (DAS). Samples of the different growing media were stored at -20 °C for analysis.

The first leaf length, stem length and shoot dry weight (72 h at 60 °C) of the plants were measured.

2.4.1 Enzyme activities

The chitinolytic activity of the substrates was measured at 15 and 45 DAS. The NAGase activity was measured for one gram of substrate, according to Parham and Deng (2000), and expressed as μmol of PNP g^{-1} dry substrate h^{-1} .

The chitinase activity was determined by measuring the quantity of *N*-acetylglucosamine formed by enzymatic hydrolysis (Rodríguez-Kabana et al, 1983). Ten millilitres of a 5% chitin solution were added to five grams of soil and incubated for 18 h at 37 °C. The *N*-acetylglucosamine formed was measured according to Johnson et al. (1971) and the

activity expressed as μg of N-acetylglucosamine g^{-1} dry substrate h^{-1} .

2.4.2 Quantification of *T. harzianum* and *F. oxysporum*

The populations of Th T-78 and FOM in the growing media were quantified using real-time PCR, with the LightCycler System (Roche). The DNA was isolated from samples of each growing medium with the FastDNA SPIN kit for Soil (Q-BIOgene), following the modifications described by López-Mondéjar et al. (2010). Th T-78 population was quantified using the primer pair ITS1 S/ITS1 R and the TaqMan probe ITS TM Fam, as described by López-Mondéjar et al. (2010), and the *F. oxysporum* population was quantified using the primer pair FOX S/FOX R and the TaqMan probe FOX TM, as described by López-Mondéjar et al. (unpublished).

2.5. Statistical analysis

The data were subjected to ANOVA analysis. When the F-statistic was significant, Tukey's post-hoc test ($P < 0.05$) was used to separate means. The statistical analyses were performed using SPSS 19.0 software (SPSS Inc.)

3. Results

3.1. Characterisation of chitin residues

The composition of the chitin residues was different according to the nature of the compounds (Table 1). Chitosan showed the highest chitin concentration (measured as glucosamine), which was up to 5- and 10-times higher than in SSP and MW, respectively. In relation to the macronutrient concentrations, the SSP showed the highest values for N, P and Ca, while the highest K concentration was found in the MW.

3.2. In vitro assay

3.2.1. Gene relative expression levels

All the chitin sources used in our study activated the expression of the assayed chitinolytic genes of Th T-78 (*exc1*, *exc2*, *chit42*, *chit33* and *chit37*) (Fig. 1). The level of relative expression was different for each gene depending on the chitin source, although for all genes it was higher at 72 h than at 48 h after inoculation. No expression was detected at 24 h after inoculation.

At 72 h, Th T-78 shown the highest expression

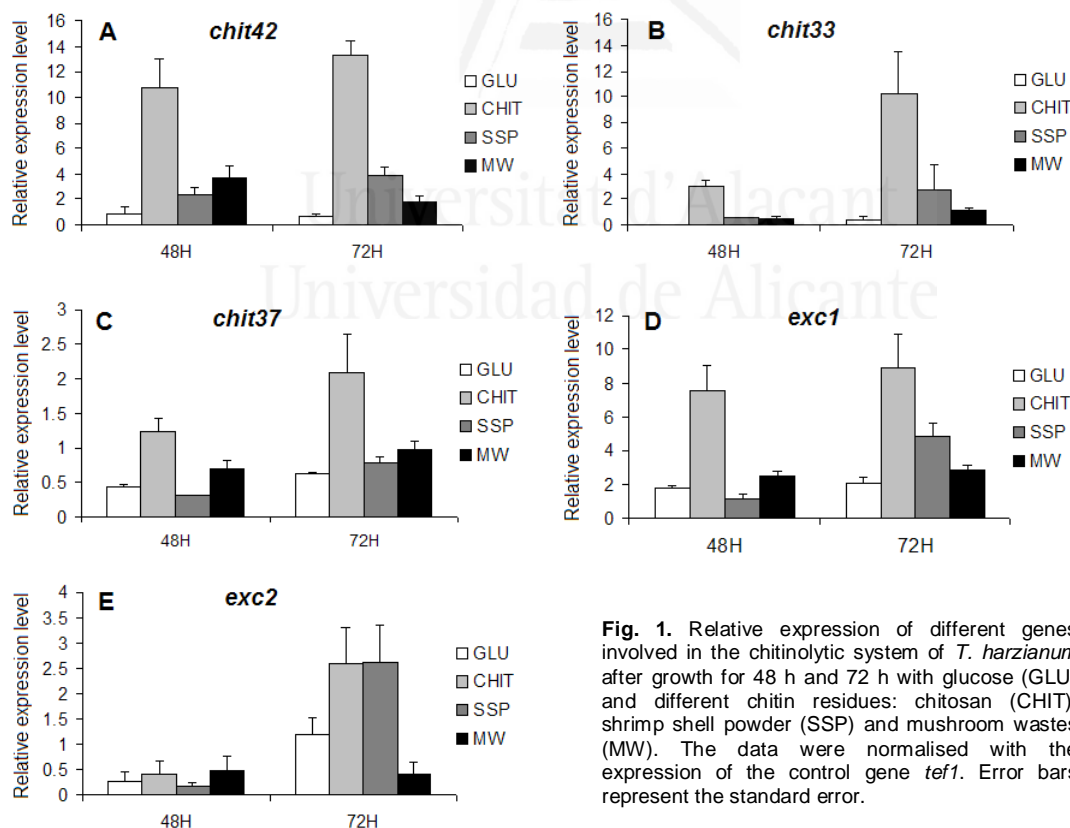


Fig. 1. Relative expression of different genes involved in the chitinolytic system of *T. harzianum* after growth for 48 h and 72 h with glucose (GLU) and different chitin residues: chitosan (CHIT), shrimp shell powder (SSP) and mushroom wastes (MW). The data were normalised with the expression of the control gene *tef1*. Error bars represent the standard error.

level for all the genes when it was grown using CHIT, followed by SSP and MW. This pattern was observed for all the genes except *chit37* and *exc2*, for which CHIT and MW showed similar expression, which was higher than for the SSP (Fig. 1E).

3.2.2. Enzyme production

The total and extracellular chitinase and NAGase activities of *Th* T-78 grown in liquid cultures with different sources of chitin as the sole carbon source were detected (Fig 2). The total and extracellular NAGase activities increased with incubation time (ANOVA, $F=320.604$, $P<0.05$; $F=4901.574$, $P<0.05$), showing their highest values after 72 h of incubation. Similar results were found for total and extracellular chitinase activity ($F=434.737$, $P<0.05$; $F=3122.549$, $P<0.05$) (Fig. 2). The values for chitinase and NAGase were higher for total activity, which includes the extracellular activity of excreted enzymes and the activity of cell wall-bound enzymes of the fungus. Both total and extracellular NAGase activities of *Th* T-78 showed significant differences according to the chitin source ($F=263.387$, $P<0.05$; $F=2618.616$, $P<0.05$), achieving their highest values when *T.*

harzianum was grown in the MW medium (Fig. 2A, B). These values were up 4-times higher than for the SSP medium or CHIT, which showed an activity similar to that where glucose (GLU) was the carbon source. The total and extracellular chitinase activities displayed a pattern similar to that of the NAGase activity, showing significant differences according to the chitin source ($F=268.210$, $P<0.05$; $F=2058.970$, $P<0.05$) (Fig. 2C, D). The highest values of chitinase activity, both total and extracellular, occurred when *Th* T-78 was grown with MW, these values being up to 5-times higher than those obtained in the other two media (SSP and CHIT).

3.3. Greenhouse experiment

3.3.1 Enzymatic activities of the growing media

Both NAGase and chitinase activities showed significant differences depending on the treatment ($F=310.115$, $P<0.05$; $F=272,771$, $P<0.05$) and the time ($F=33.862$, $P<0.05$; $F=382.589$, $P<0.05$). The highest NAGase activities occurred when *Th* T-78 was present in the medium, for all the chitin residues used, the P+MW+*Th* T-78 and P+CHIT+*Th* T-78

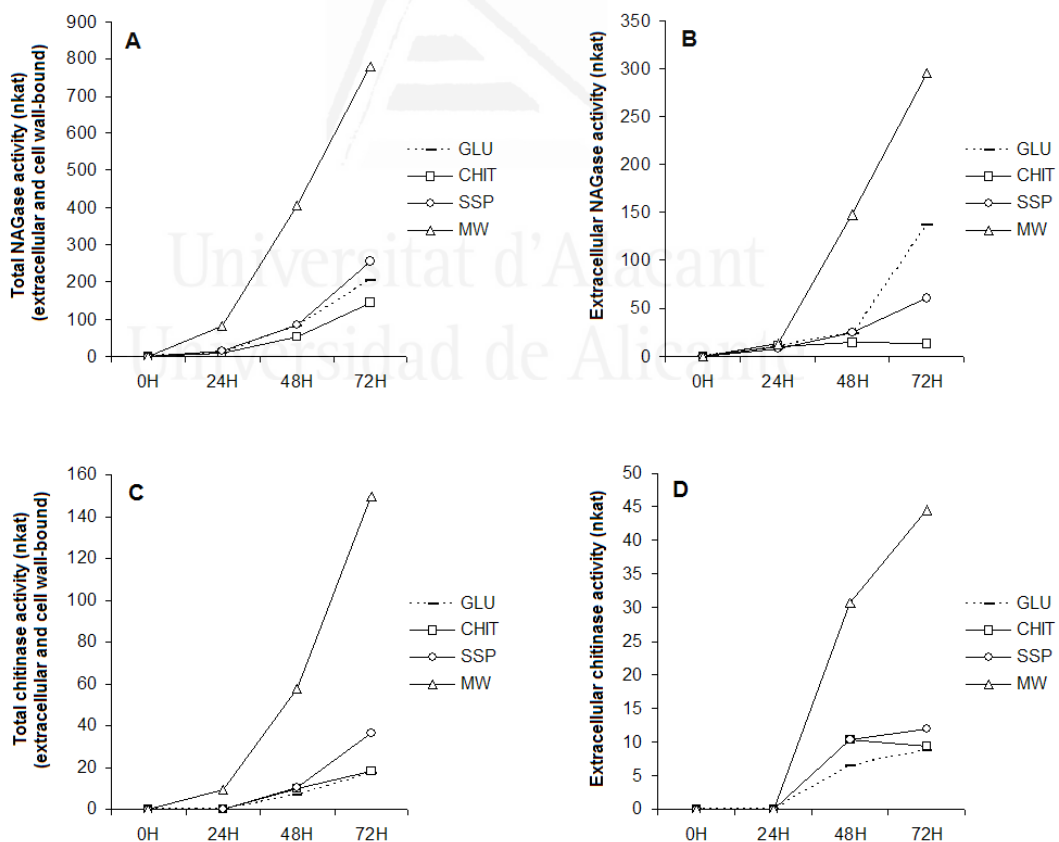


Fig 2. Enzymatic activities involved in the chitinolytic system of *T. harzianum* grown on flask cultures. (A) Total (extracellular and cell wall-bound) NAGase activities, (B) extracellular NAGase activities, (C) total (extracellular and cell wall-bound) chitinase activities and (D) extracellular chitinase activities. The activities were normalised with the biomass (nKat/μg protein).

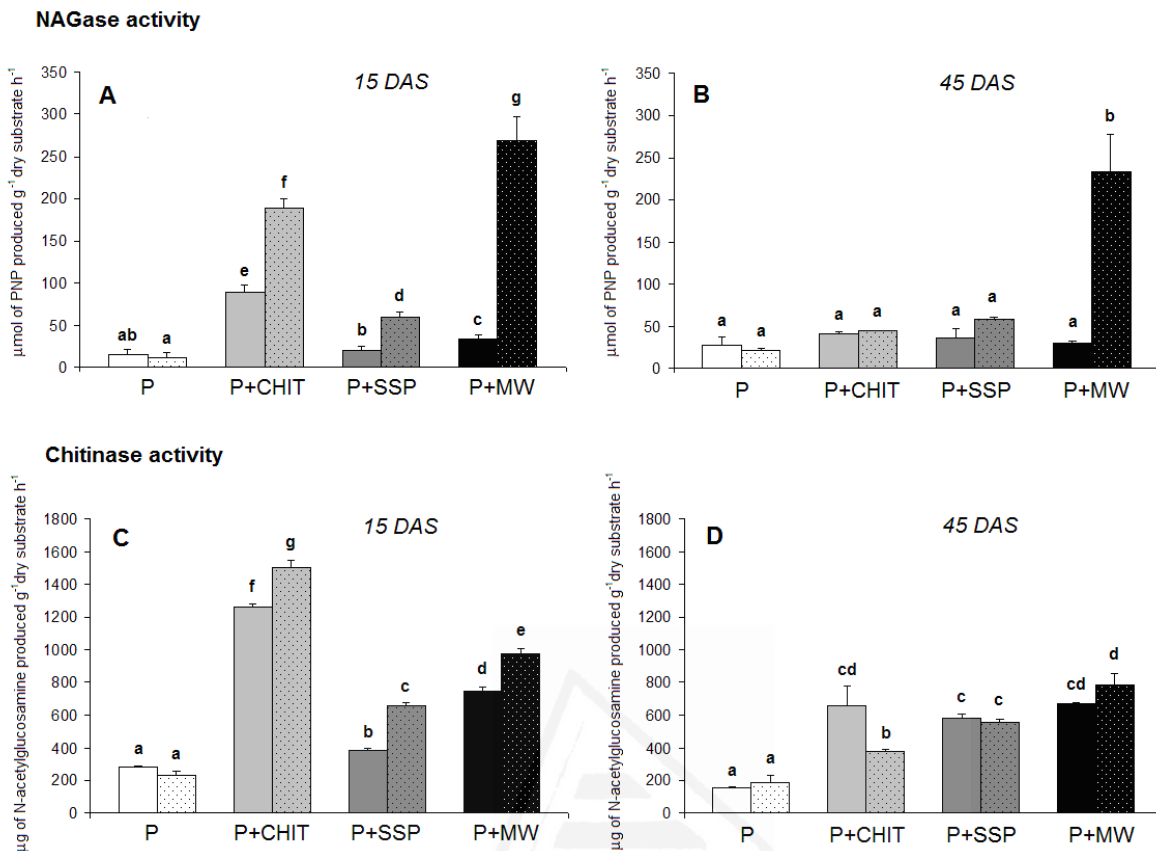


Fig. 3. Chitinolytic activities due to different treatments, at 15 DAS and 45 DAS: peat (P, white bars), peat amended with chitosan (P+CHIT, light-grey bars), peat amended with shrimp shell powder (P+SSP, dark-grey bars) and peat amended with mushroom wastes (P+MW, black bars). The treatments involving inoculation with *T. harzianum* (Th T-78) are shown as dotted bars. Error bars represent the standard error. For each sampling time, values with the same letter do not differ significantly according to Tukey's post-hoc test ($P < 0.05$).

treatments showing the highest values (Fig. 3A). The NAGase activity had decreased at 45 DAS in all the treatments with the exception of P+MW+Th T-78, where the activity values were maintained (Fig. 3B).

The chitinase activity showed a pattern similar to that of the NAGase activity (Fig. 3C, D). The highest values were found in treatments involving chitin residues and inoculation with *T. harzianum*, and the activity also decreased along the experiment. The highest chitinase activity was produced by the treatments which included chitosan, followed by treatment with MW and treatment with SSP.

The NAGase and chitinase activities in the peat treatment (P) were very low in comparison with treatments involving amendment with chitin residues, even when Th T-78 was inoculated (P+Th T-78).

Similar results for both chitinolytic activities were obtained when FOM was inoculated in the substrate (data not shown).

3.3.2. Plant growth in growing media not inoculated with *F. oxysporum*

The incorporation of chitin sources enhanced the length of both the first leaf ($F=20.642$, $P < 0.05$) and the stem ($F=6.090$, $P < 0.05$) of muskmelon seedlings,

for all the treatments, independent of the inoculation of Th T-78 in the growing media (Table 2). Treatments which included inoculation with Th T-78 gave slightly-greater leaf length and stem length than those without Th T-78. The addition of SSP produced the greatest first leaf and stem length, followed by the treatment involving chitosan.

The shoot dry weight of muskmelon seedlings measured 45 DAS differed significantly according to the treatment ($F=120.107$, $P < 0.05$) (Fig. 4A). The treatments involving amendment with chitin residues gave higher values than the peat treatment, independent of the inoculation of Th T-78. Treatment with SSP produced the highest value, followed by chitosan and MW (Fig. 4A). Th T-78 did not affect the shoot dry weight, except for the treatment with chitosan.

3.3.3 Plant growth in growing media inoculated with *F. oxysporum*

The presence of *F. oxysporum* affected negatively the shoot dry weight, for all the treatments assayed ($F=228.804$, $P < 0.05$) (Fig. 4B). The incorporation of the different chitin sources gave rise to higher values than for peat alone, as was observed

also in the absence of the pathogen. The addition of *T. harzianum* produced a significantly-higher dry weight, for all the treatments.

3.3.4. Quantification of the *Th* T-78 and FOM populations

The populations of *Th* T-78, determined by real-time PCR, were similar in the growing media with or without inoculation with FOM ($F=0.057$, $P>0.05$) (Table 3). The treatment including amendment with MW (P+MW+*Th* T-78) showed the highest population of *Th* T-78, followed by peat amended with SSP (P+SSP+*Th* T-78) ($F=35.533$, $P<0.05$). The populations of *Th* T-78 in the peat (P+*Th* T-78) and the peat amended with chitosan (P+CHIT+*Th* T-78) were similar. No significant differences were found in the pathogen population (FOM) among the different treatments ($F=1.859$, $P>0.05$) (Table 3).

Table 2. First leaf length and stem length of melon seedlings at 45 DAS, for the different treatments of the greenhouse experiment. Values in the same column with the same letters represent no significant difference between treatments according to Tukey's post-hoc test ($P<0.05$).

Treatment	First leaf length (cm)	Stem length (cm)
Peat	6.71±0.15 a	4.06±0.19 a
Peat+CHIT	8.95±0.17 cd	4.77±0.31 ab
Peat+SSP	9.81±0.28 de	5.74±0.33 bc
Peat+MW	8.15±0.22 bc	5.15±0.19 bc
Peat+ <i>Th</i> T-78	7.33±0.33 ab	4.96±0.16 abc
Peat+CHIT+ <i>Th</i> T-78	9.88±0.36 de	5.90±0.19 c
Peat+SSP+ <i>Th</i> T-78	10.3±0.39 e	5.41±0.24 bc
Peat+MW+ <i>Th</i> T-78	8.36±0.25 bc	5.35±0.18 bc

4. Discussion

The use of chitin-rich residues is a good way of activating the chitinolytic potential of the fungus *T. harzianum*. In our experiment, all the chitin sources assayed activated the complex of chitinolytic genes (*chit42*, *chit33*, *chit37*, *exc1* and *exc2*) of *Th* T-78. It is known that chitin, chitosan and their oligomers are able to activate the chitinase and NAGase genes (Viterbo et al., 2002). Our data show that after 72 h of

incubation, in general, chitosan (CHIT) produced the highest expression level for all these genes, followed by shrimp shell powder (SSP) and mushroom wastes (MW). These different levels of expression may be due to the differing compositions of the chitin sources, being directly related with the chitin richness (glucosamine) of the different organic substrates. These oligosaccharides have been shown to act as a signal indicating that the process of fungal cell wall degradation has commenced (Ramot et al., 2004), activating the expression of chitinolytic enzymes

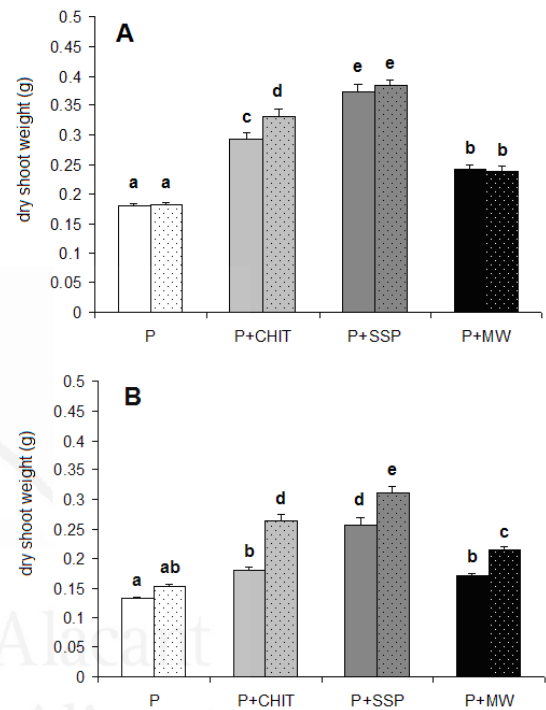


Fig 4. Dry shoot weight (grams) of muskmelon seedlings grown in the different treatments, at 45 DAS. (A) Without inoculation of pathogen and (B) with the inoculation of *F. oxysporum* (FOM). The treatments involving inoculation with *T. harzianum* (*Th* T-78) are shown as dotted bars. Error bars represent the standard error. Columns with the same letter do not significantly differ according to Tukey's post-hoc test ($P<0.05$).

Table 3. Quantification of *T. harzianum* and *F. oxysporum* in the growing media of the greenhouse experiment, at 45 DAS. Values in the same column with the same letters represent no significant difference between treatments according to Tukey's post-hoc test ($P<0.05$).

Treatment	Log <i>T. harzianum</i> ITS copies g ⁻¹ substrate		Log <i>F. oxysporum</i> SCAR copies g ⁻¹ substrate
	Not inoculated with <i>F. oxysporum</i>	Inoculated with <i>F. oxysporum</i>	
Peat+ <i>Th</i> T-78	7.63±0.13 a	7.31±0.14 a	5.44±0.05 a
Peat+CHIT+ <i>Th</i> T-78	7.33±0.08 a	7.70±0.02 a	5.57±0.07 a
Peat+SSP+ <i>Th</i> T-78	8.66±0.10 b	8.82±0.07 b	5.37±0.07 a
Peat+MW+ <i>Th</i> T-78	9.26±0.04 c	9.20±0.05 c	5.62±0.06 a

(Seidl et al., 2006). The higher proportion of these oligomers in CHIT could activate this process before the other sources, producing a higher expression level. At 48 h, the highest expression levels were found for *chit42* and *exc1*, in accordance with several studies that have shown the early expression of these genes when chitin sources are present in the medium (Zeilinger et al., 1999), due to their involvement in signalling in the early stages of the mycoparasitic activity of this fungus. However, these molecular expression levels were not related with the total and the extracellular NAGase and chitinase activities measured in the culture media, where MW showed the highest activity compared with the other chitin sources. It is known that discrepancies sometimes exist between the level of an mRNA and that of the corresponding protein (Massart and Jijakli, 2007). This higher chitinase activity in MW samples might be due also to the expression of other chitinases encoded by genes that were not studied in our experiment, because at least two more chitinases have been described for *T. harzianum* (Rincón et al., 2008). The NAGase activity was not related either with the gene expression level. However, it has been shown that only two genes, *nag1* and *nag2*, encode this activity in *Trichoderma atroviride* (López-Mondéjar et al., 2009); these are equivalent to genes *exc1* and *exc2* in *T. harzianum*. The low activities found in the CHIT and SSP samples, very similar to those of the glucose medium, may be due to the composition of these chitin sources. The chitosan present in CHIT and SSP is charged positively and has been shown to produce structural changes in the cell wall and membranes of the hyphae of the fungus (Xu et al., 2007; Li et al., 2009). These changes can prevent the excretion of enzymes through the fungal membranes. Moreover, some studies showed that these compounds can inhibit the synthesis of proteins (Bautista-Baños et al., 2006). This hypothesis is supported by the low Th T-78 biomass values found in the media with CHIT or SSP (data not shown), since these compounds can inhibit the growth of the fungus. This antifungal activity of chitosan has been used against many plant pathogens. Palma-Guerrero et al. (2008) showed that the growth of mycoparasitic fungi such as *T. harzianum* and *T. atroviride*, as well as of other pathogenic fungi, can be inhibited under *in vitro* conditions by the presence of chitosan at certain doses. The lack of chitosan in MW, whose presence has been reported only in some species of Basidiomycetes (Di Mario et al., 2008), could explain the absence of inhibition of fungal growth observed for this chitin waste. The expression found for some genes, such as *exc1* and *exc2*, in the medium with glucose, together with the activity values at 72 h, was due to the death of part of the mycelia, which releases chitin and oligomers into the medium, activating these chitinolytic genes. Moreover, the gene expression in the glucose medium may be due also to low constitutive activity of the assayed genes, which triggers their induction when a host is at close range (Lora et al., 1995; Zeilinger et al., 1999).

In the greenhouse nursery experiments, the amendment with chitin residues increased both the chitinase and NAGase activities in the growing media, in comparison with non-amended peat (P). This increase was higher in substrates inoculated with Th T-78, the highest activities occurring when Th T-78 was incorporated together with CHIT and MW. Under these *in vivo* conditions, part of the chitosan added could have been degraded by other, natural chitinolytic enzyme-producing microorganisms that colonise the substrate (Hayes et al., 2008), as can be appreciated in the natural chitinolytic activity of the peat treatment when chitin residues were added. This action decreased the negative effect of chitosan shown in the *in vitro* liquid cultures, allowing the excretion of hydrolytic enzymes by *T. harzianum*. Both activities decreased with time, with the exception of peat amended with MW and Th T-78. This high chitinolytic activity found 45 DAS was related to the total population of Th T-78, since the highest number of ITS copies per gram of substrate was found at this point. The fungal origin of MW, with a composition more similar to that of the potential prey of *T. harzianum*, may make it a better nutrient source for Th T-78. In fact, numerous authors have reported *T. harzianum* as a parasite of *A. bisporus* in mushrooms cultures, the origin of MW (Samuels et al., 2002). The use of MW might be a good way to increase the population of *T. harzianum* in growing media, rather than other chitin sources of animal origin (such as SSP).

The addition of chitin-rich compounds to peat-based growing media has been shown, in some cases, to reduce the amount of pathogen (Rose et al. 2003; Ha and Huang, 2007). However, the populations of *F. oxysporum* remained constant in all the treatments assayed. Despite this, the plants grown in peat amended with chitin residues and Th T-78 showed a lower effect of the pathogen, with a lesser reduction of shoot dry weight than for plants that were not inoculated with Th T-78. The presence of *T. harzianum* in amended substrates maintained the shoot dry weight of muskmelon plants, in comparison with substrates that were not amended with chitin residues or inoculated with the BCA. The maintenance of shoot dry weight in P+Th T-78, which was not amended with a chitin source, demonstrates that other mechanisms besides mycoparasitism can be implicated in this response to the presence of the pathogen. The biocontrol mechanisms of *T. harzianum* include production of antibiotic compounds and competition for nutrients, as well as the activation of systemic resistance in plants (Howell, 2003). Moreover, some authors have pointed out that chitin oligomers can also elicit induced systemic resistance in plants (Tsutsui et al., 2006; Amboradé et al., 2008; Kishimoto et al., 2010). Roby et al. (1987) reported that different chitin oligosaccharides are efficient elicitors of chitinase activity in tissues of melon seedlings. These mechanisms are in accordance with the better maintenance of shoot dry weight for treatments

involving amendment with chitin residues in our study, relative to peat alone. It would be interesting to investigate whether these processes of plant resistance also occur in the substrates assayed, complementing the activation of the chitinolytic system found in our experiment.

The use of chitin-rich residues as amendments of the growing media had a positive effect on the nutritional aspects. All the treatments involving amendment with a chitin residue gave a greater growth of muskmelon plants than did the non-amended peat. These results have been seen also by other authors who used SSP, for cucumber or asparagus bean (Rose et al., 2003; Ha and Huang, 2007). This increase was due to the extra contribution of nutrients, mainly nitrogen, that enhance seedling growth. Moreover, the inoculation of Th T-78 can improve the growth of seedlings in growing media amended with chitosan, due to the biostimulation activity of the isolate T-78, as has been shown by previous work (Bernal-Vicente et al., 2009).

The compositions of the chitin residues tested in our assay support their utilisation as amendments of peat, in order to enhance the nutrition of seedlings in greenhouse nurseries. The *in vitro* experiments showed that all these compounds were able to activate the genes encoding chitinolytic activities of *T. harzianum*. Moreover, when these residues were mixed with peat, as growing media, the possible inhibitory effects seen under *in vitro* conditions were diluted, allowing activation of the chitinolytic system of the BCA and of natural microorganisms from the substrates. This increase in the chitinolytic activity of *T. harzianum* maintained a higher shoot dry weight in the presence of a pathogen. The use of small quantities of these residues and of Th T-78 enhanced the growth of muskmelon seedlings and decreased the weight loss due to *F. oxysporum*. The use of these residues for seedling production adds value to them, enhancing the management of the thousands of metric tons of these residues generated around the world each year.

References

- Amborabé, B.E., Bonmort, J., Fleurat-Lessard, P., Roblin, G., 2008. Early events induced by chitosan on plant cells. *Journal of Experimental Botany* 59, 2317–2324.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L., 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25, 108–118.
- Bernal-Vicente, A., Ros, M., Pascual, J.A., 2009. Increased effectiveness of the *Trichoderma harzianum* isolate T-78 against *Fusarium* wilt on melon plants under nursery conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 827–833.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156–159.
- De Boer W., Gerards S, Klein Gunnewiek PJA, Modderman R., 1999. Response of chitinolytic microbial community to chitin amendments of dune soils. *Biology and Fertility of Soils* 29, 170–177.
- Di Mario, F., Rapanà, P., Tomati, U., Galli, E., 2008. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 8–12.
- Dutta, P.K., Dutta, J.D., Tripathi, V.S., 2004. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research* 63, 20–31.
- Gokul, B., Lee, J.H., Song, K.B., Rhee, S.K., Kim, C.H., Panda, T., 2000. Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum* – a review. *Bioprocess Engineering* 23, 691–694.
- Ha, M.T., Huang, J.W., 2007. Control Fusarium wilt of asparagus bean by organic soil amendment and microorganisms. *Plant Pathology Bulletin* 16, 169–180.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I., 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86, 980–985.
- Hayes, M., Carney, B., Slater, J., Brück, W., 2008. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: Chitin and chitosan – Part B: Applications. *Biotechnology Journal* 3, 878–889.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species – Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2, 43–56.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Diseases* 87, 4–10.
- Huang, C., Yang, Q., 2008. Heterologous expression of an endochitinase Chit37 from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Biotechnology* 136S, S261–S268.
- Johnson, A.R., 1971. Improved method of hexosamine determination. *Analytical Biochemistry* 44, 628–35.
- Kishimoto, K., Kouzai, Y., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E., Nishizawa, Y., 2010. Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice. *The Plant Journal* 64, 343–354.
- Kumar, M.N.V.R., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* 46, 1–27.
- Li, Y.C., Sun, X.J, Bi, Y., Ge, Y.H., Wang, Y., 2009. Antifungal activity of chitosan on *Fusarium sulphureum* in relation to dry rot potato tuber. *Agricultural Sciences in China* 8, 597–604.
- López-Mondéjar, R., Catalano, V., Kubicek, C.P., Seidl, V., 2009. The β -N-acetylglucosaminidases

- NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma atroviride* on chitin. FEBS Journal 276, 5137–5148.
- López-Mondéjar, R., Antón, A., Raidl, S., Ros, M., Pascual, J.A., 2010. Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass. Bioresource Technology 101, 2888–2891.
- López-Mondéjar, R., Ros, M., Pascual, J.A., 2011. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. Biological Control 56, 59–66.
- López-Mondéjar, R., Beaulieu, R., Ros, M., Pascual, J.A., 2011. SCAR-based real-time TaqMan PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions. Under review.
- Lora, J.M., Cruz, J., Llobell, A., Benítez, T., Pintor-Toro, J.A., 1995. Molecular characterization and heterologous expression of an endo- β -1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Molecular and General Genetics 247, 639–645.
- Massart, S., Jijakli, H.M., 2007. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: A review. Journal of Microbiological Methods 69, 229–241.
- Nash, S.M., Snyder, W.C., 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soil. Phytopathology 52, 567–572.
- Palma-Guerrero, J., Jansson, H.B., Salinas, J., Lopez-Llorca, L.V., 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. Journal of Applied Microbiology 104, 541–553.
- Parham, J.A., Deng, S.P., 2000. Detection, quantification and characterization of β -glucosaminidase activity in soil. Soil Biology & Biochemistry 32, 1183–1190.
- Ramot, O., Viterbo, A., Friesem, D., Oppenheim, A., Chet, I., 2004. Regulation of two homodimer hexosaminidases in the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* by glucosamine. Current Genetics 45, 205–213.
- Rincón, A.M., Codón, A.C., Benítez, T., 2008. Hidrolasas y genes fúngicos de interés en biocontrol. In: Pallás, V., Escobar, C., Rodríguez Palenzuela, P., Marcos, J.F. (Eds.), Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 345–368.
- Roby, D., Gadellef, A., Toppan, A., 1987. Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. Biochemical and Biophysical Research Communications 143, 885–892.
- Rodríguez-Kabana, R., Godoy, G., Morgan-Jones, G., Shelby, R.A., 1983. The determination of soil chitinase activity: Conditions for assay and ecological studies. Plant and Soil 75, 95–106.
- Rose, S., Parker, M., Punja, Z. K. 2003. Efficacy of biological and chemical treatments for control of *Fusarium* root and stem rot on greenhouse cucumber. Plant Disease 87, 1462–1470.
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A., Petrini, O., 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia 94, 146–170.
- Seidl, V., 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. Fungal Biology Reviews 22, 36–42.
- Seidl, V., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., 2006. A screening system for carbon sources enhancing β -N-acetylglucosaminidase formation in *Hypocrea atroviridis* (*Trichoderma atroviride*). Microbiology 152, 2003–2012.
- Shibuya, N., Minami, E., 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. Physiological and Molecular Plant Pathology 59, 223–233.
- Tsutsui T, Morita-Yamamuro C, Asada Y, Minami E, Shibuya N, Ikeda A, Yamaguchi J., 2006. Salicylic acid and a chitin elicitor both control expression of the CAD1 gene involved in the plant immunity of Arabidopsis. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 70, 2042–8.
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valéro, J.R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal 37, 1–20.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M., 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions in soil agro-ecosystems, Soil Biology & Biochemistry 40, 1–10.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chemin, L., Chet, I., 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie van Leeuwenhoek 81: 549–556.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Conway, W.S., Sams, C.E., 2005. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 3888–3894.
- Xu, J., Zhao, X., Han, X., Du, Y., 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. Pesticide Biochemistry and Physiology 87, 220–228.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Prayer, K., Woo, S.L., Mach, R.L., Fekete, C., Lorito, M., Kubicek, C.P., 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Functional Genetics and Biology 26, 131–140.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

VIII. Discusión general

Discusión general

El empleo de aislados de *Trichoderma harzianum* en agricultura ofrece buenas alternativas al uso de productos químicos. Esta gran efectividad es debida principalmente a las características únicas de este hongo que le confieren una gran capacidad como agente de control biológico (ACB) de enfermedades en plantas (Schuster y Schmoll, 2010). La gran capacidad antagonista de esta especie se ha demostrado frente a numerosos fitopatógenos tales como los del género *Fusarium*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* y *Pythium* (Hjeljord y Tronsmo, 1998), responsables en muchos casos de efectos devastadores en los cultivos. Es por ello, que los aislados del género *Trichoderma* se han utilizado ampliamente como ACB, representando más del 60% de los biofungicidas existentes en el mercado (Verma y col., 2007). En concreto, la especie *T. harzianum* destaca como una buena alternativa para controlar importantes enfermedades vegetales, como la fusariosis vascular en semillero, en la producción de planta para agricultura ecológica (Bernal-Vicente y col., 2009). La aplicación de este hongo antagonista requiere, sin embargo, de herramientas eficaces que nos permitan estudiar y conocer su evolución y desarrollo tras su inoculación en los sustratos utilizados en el semillero, así como profundizar en los mecanismos implicados en su efecto biocontrol frente a microorganismos fitopatógenos.

Los métodos moleculares desarrollados en las últimas décadas resultan herramientas efectivas no solo en la monitorización de hongos antagonistas y microorganismos fitopatógenos, sino también en el estudio de las diferentes propiedades del control biológico del hongo. Su aplicación en el campo del control biológico puede ayudar, en muchos casos, a mejorar tanto el entendimiento sobre su funcionamiento, como su utilización práctica (Massart y Jijakli, 2007). A su vez, las técnicas moleculares permiten la rápida diagnosis de patógenos de plantas, mejorando el control de las enfermedades vegetales (McCartney y col., 2003; Atkins y Clark, 2004).

En esta Tesis Doctoral se han empleado diferentes herramientas moleculares basadas en la PCR con los hongos *T. harzianum* y *Fusarium oxysporum* tanto en

condiciones *in vitro* (en laboratorio) como *in vivo* (con planta en semillero) bajo el marco de la agricultura ecológica. El uso de estas técnicas, principalmente de la PCR a tiempo real, permitió monitorizar *T. harzianum* no sólo en medios de cultivo, sino también en muestras de sustratos orgánicos, como se ha visto en los Capítulos 1 y 2. Para ello se desarrolló un sistema *TaqMan* de cebadores y sonda en el espaciador ribosomal ITS1 del hongo. La región ITS del genoma es una de las más usadas para la identificación y detección de hongos, ya que se trata de una región muy repetida en el genoma, y que presenta gran variabilidad en su secuencia (Bridge y Spooner, 2001; Atkins y col., 2003; Lievens y col., 2006). Esta región ha sido seleccionada por numerosos autores para el desarrollo de cebadores específicos para la detección de hongos micorrícicos como *Glomus intraradices* (Filion y col., 2003), hongos antagonistas como *Plectosphaerella cucumerina* (Atkins y col., 2003) y hongos fitopatógenos como *Fusarium solani*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium* spp. (Lievens y col., 2006). Nuestro sistema para PCR a tiempo real permitió amplificar todos los aislados de *T. harzianum* usados en nuestro experimento, y no el resto de especies utilizadas. La elección de esta región del genoma del hongo favorece el empleo de este sistema *TaqMan* con los diferentes aislados de *T. harzianum* que puedan usarse en el control biológico, a diferencia de los sistemas desarrollados por otros autores específicamente diseñados para un aislado concreto de *T. harzianum* (Rubio y col., 2005) o *T. atroviride* (Cordier y col., 2007; Savazzini y col., 2008) basados en marcadores específicos o mutaciones en un determinado gen. La elección de una sonda *TaqMan* para la detección de *T. harzianum* ofreció mayor especificidad que otros sistemas como el SYBR Green, debido a la especificidad adicional aportada por la sonda (Schena y col., 2004).

Sin embargo, el desarrollo de cebadores y sondas en la región ITS no siempre es posible. Cuando esta región está muy conservada hay que buscar genes alternativos, generalmente genes de referencia, como los que codifican por ejemplo para el factor de la elongación o para la β -tubulina. En algunos casos, como por ejemplo en el hongo *F. oxysporum*, la variabilidad en estos genes también es escasa (McCartney y col., 2003). En estos casos, el diseño de las sondas se realiza sobre secuencias o marcadores SCAR obtenidos mediante RAPD-PCR, lo que ha

permitido la detección de algunas formas especiales de *F. oxysporum* (Pasquali y col., 2006; Lievens y col., 2007). En el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral recogemos el desarrollo de un sistema *TaqMan* basado en un marcador SCAR obtenido para *F. oxysporum*. Este sistema permitió la detección específica de este hongo, no amplificando ninguno de los otros patógenos del melón empleados en el estudio.

El empleo de estos sistemas moleculares nos permitió además de detectar, cuantificar la cantidad de secuencias diana presente en la muestra a estudiar mediante el desarrollo de curvas estándar. Para la construcción de estas curvas se emplearon diluciones de plásmidos donde previamente se clonó la secuencia de interés. Las curvas basadas en estas diluciones permitieron relacionar los valores de Ct con el número de copias de la secuencia de interés, región ITS o marcador SCAR en nuestro caso, ofreciendo medidas más reales sobre la cantidad de microorganismo presente en la muestra (Savazzini y col., 2008), que otros estudios que han empleado curvas basadas en diluciones de ADN para calibrar la PCR a tiempo real (Filion y col., 2003). Las eficiencias de las curvas estándar obtenidas en los Capítulos 1 y 3 tanto para *T. harzianum* como para *F. oxysporum*, fueron cercanas al valor 2, valor óptimo que indica que cada ciclo de PCR duplica la cantidad inicial de ADN (Zhang y Fang, 2006). Esto permitió su uso para cuantificar esas secuencias.

Además, en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral también se extrapolaron las medidas obtenidas por PCR a tiempo real (copias de la secuencia) a unidades de biomasa fúngica (peso seco) de hongo. Esta extrapolación a biomasa permitiría obtener una medida del ACB más realista acerca de la cantidad de hongo presente en la muestra. Para ello se realizaron preparaciones microscópicas de cultivos de *T. harzianum* que permitieron medir la longitud de las hifas. Estas medidas se transformaron a peso seco de acuerdo con Raidl y col., (2005), teniendo en cuenta el diámetro de las hifas del hongo. Nuestros datos aportaron una fórmula que permite extrapolar los valores de copias de ITS a longitud de hifas, obteniéndose además un número de copias del gen por longitud de hifa, con un valor de R^2 de la regresión similar al valor obtenido por Raidl y col. (2005) con el hongo ectomicorrícico *Piloderma croceum*. Esta fórmula puede verse afectada sin embargo por

movimientos citoplasmáticos registrados en las hifas de los hongos (Suelman y Fisher, 2000), junto a diferentes características del micelio, como la edad o el porcentaje de ramificación (Raidl y col., 2005). A pesar de esto, nuestros datos permitieron expresar los resultados moleculares obtenidos con PCR a tiempo real como medidas de biomasa microbiana.

El sistema *TaqMan* permitió detectar y cuantificar *T. harzianum* en los sustratos orgánicos empleados en semillero, tal y como se describe en los Capítulos 2 y 5. Además, los valores de cuantificación obtenidos con este sistema se correlacionaron con los valores obtenidos mediante conteo en placa (UFCs). Estos resultados podrían indicar la posible sustitución de las técnicas de dilución en placa por la PCR a tiempo real para cuantificar *T. harzianum*, que es más rápida, sensible y específica (Schena y col., 2004).

En el Capítulo 2, se aplicó la qRT-PCR para solucionar uno de los principales limitaciones de la PCR a tiempo real: la distinción entre el material activo (micelio) y el no activo (conidias o micelio muerto) (Bridge y Spooner, 2001). Los ARN ribosomales sintetizados por el ACB pueden aislarse, retrotranscribirse, y usarse para medir la cantidad de micelio activo, tal como ha sido descrito por Anderson y Parkin (2007). Como hemos visto en el Capítulo 2, las curvas de población activa, obtenidas con qRT-PCR, fueron muy diferentes a las curvas de población total, obtenidas con dilución en placa y PCR a tiempo real. La qRT-PCR permitió conocer como la cantidad de *T. harzianum* activo en el sustrato aumentaba continuamente a lo largo del experimento. Estos datos indicaron que el ACB sobrevivió y se desarrolló en los sustratos orgánicos empleados, tanto turba como compost, pudiendo expresar sus mecanismos de biocontrol en la rizosfera de la planta (Lo y col., 1998). Este tipo de curva de crecimiento de *T. harzianum* no se observó usando las otras técnicas de cuantificación (PCR a tiempo real y UFCs), las cuales mostraban un ligero ascenso de las poblaciones de *T. harzianum* que disminuía con el tiempo. Esta diferencia pudo ser debido a que estos métodos cuantificaron principalmente las formas inactivas presentes en el sustrato (conidias). Así, por ejemplo, a los 5 días después de la infección, la mayor parte del ADN cuantificado con PCR a tiempo real correspondería a la gran cantidad de esporas inoculadas en el medio, lo que

concuenda con la baja cantidad de micelio activo en ese tiempo. La cantidad de esporas en el sustrato disminuyó con el paso del tiempo, aunque el número de copias de ITS no se redujo drásticamente debido a las copias aportadas por el ADN del micelio activo. Todos estos cambios entre la cantidad de micelio activo e inactivo sólo pudieron ser observados gracias a la qRT-PCR, siendo nuestro estudio el primero en cuantificar la cantidad de *T. harzianum* activo en sustratos, a diferencia de estudios previos como los presentados por Savazzini y col. (2008) y Longa y col. (2009), que sólo cuantificaban la población total de ACB.

Los resultados obtenidos en el Capítulo 2 mostraron el empleo de los compost inoculados con ACBs como sustratos alternativos al empleo de turbas en semillero, tal y como se ha indicado por algunos autores (De Ceuster y Hoitink, 1999; Alavoubette y col., 2006). Las plántulas crecidas en estos sustratos presentaron un menor porcentaje de infección por *F. oxysporum* que las crecidas en turba, así como una menor pérdida de peso fresco. Estos datos concuerdan con experimentos anteriores, sobre la efectividad de controlar la fusariosis vascular mediante compost inoculados con *T. harzianum* (ej. López-Mondéjar y col., 2010). El empleo de compost inoculados con diferentes ACBs se ha utilizado para controlar diversas enfermedades de plantas por numerosos autores, supliendo la falta de otros microorganismos antagonistas en la matriz del compost (Cotxarrera y col. 2002; Postma y col., 2003; Trillas y col., 2006; Sant y col., 2010). Además, las plántulas crecidas en los compost presentaron un mayor contenido en algunos macronutrientes (P y K), que las crecidas en turba, debido al aporte nutricional y de materia orgánica de los compost (Yogev y col., 2006). El empleo de estos compost inoculados con *T. harzianum* puede ser una buena solución para controlar la fusariosis vascular en semillero, evitando la infección de las plántulas, y mejorando el estado nutricional de las mismas. Además, la producción de compost para su uso en semillero favorece el reciclaje de residuos orgánicos, tal como se persigue en las nuevas regulaciones europeas (Alavoubette y col., 2006). Este uso favorece además la reducción del empleo de turbas en semillero, y disminuyendo así la presión extractiva sobre las turberas europeas (Tittarelli y col., 2009).

En esta Tesis Doctoral, además de realizar la monitorización del agente biocontrol *T. harzianum*, se desarrolló un sistema molecular para la detección rápida y eficaz del patógeno *F. oxysporum*. La importancia de este patógeno, debido a las enormes pérdidas que causa en numerosos cultivos, ha llevado a la publicación en los últimos años de diversos estudios moleculares destinados a la detección y cuantificación de aislados de este patógeno (Zhang y col., 2005; Zambounis y col., 2007; Jiménez-Fernández y col., 2010; Lin y col., 2010; Validov y col., 2011), tanto en suelo como en planta. En el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral se diseñó, utilizó y validó satisfactoriamente un nuevo sistema *TaqMan* basado en un marcador SCAR para monitorizar la población de *F. oxysporum* bajo condiciones de semillero. Nuestro sistema permitió la detección de diferentes *formae speciales* de *F. oxysporum* que pueden infectar no solo a cultivos de melón, sino también a otros cultivos como tomate, sandía, clavel o pepino, ampliándose de esta forma el rango de aplicación de este sistema en otros cultivos. En este Capítulo se monitorizó con PCR a tiempo real la población del patógeno en el sustrato de crecimiento (turba) durante el crecimiento de las plántulas de melón, comparándolo con técnicas tradicionales de cultivo en placa. Los semilleros presentan las condiciones ambientales ideales para el desarrollo del patógeno, favoreciendo su dispersión mediante el agua de riego, los sustratos o las herramientas infectadas (Gómez y Tello, 2000b). Así, por ejemplo, Waller y col. (2008) y Al-Sadi y col. (2011) detectaron la presencia de este hongo en sustratos orgánicos empleados en semilleros. Mediante la aplicación de este sistema molecular se comprobó que la población de *F. oxysporum* permaneció constante en aquellos sustratos a los que se les inoculó durante el cultivo de plántulas de melón. Estos datos concordaron con los obtenidos con las técnicas clásicas de dilución en placa, donde tampoco se obtuvo variación en la población del patógeno. Esta persistencia del patógeno en el sustrato ha sido también demostrada por otros autores como Suárez-Estrella y col. (2004).

Este sistema basado en PCR a tiempo real también se empleó para detectar el patógeno en tejidos vegetales de la plántula antes de que éstas mostraran síntomas de la enfermedad. La detección temprana de este patógeno resulta de vital importancia, ya que lotes de plántulas infectadas pueden contaminar otras plantas, o

ser llevadas al campo, extendiendo de este modo la enfermedad (Blancard y col., 1991, Suárez-Estrella y col., 2003). El sistema *TaqMan* permitió detectar cantidades muy bajas del patógeno (niveles menores a 100 copias del marcador SCAR) en los tejidos de la planta, a pesar de que probablemente la cantidad de hongo en el sistema vascular vegetal sería muy bajo al encontrarse las plantas en las primeras etapas de la infección, antes de que apareciesen los síntomas de la enfermedad. El empleo de esta técnica molecular, además de aportar mayor sensibilidad en la detección del patógeno que los medios de cultivo en placa, proporcionó los resultados de una forma más rápida, menos de 48 horas, frente a los seis días necesitados con las técnicas tradicionales de cultivo en placa. Esta rapidez en la detección, ayudará a mejorar el control efectivo del patógeno, evitando su desarrollo y dispersión en el semillero. Esto podría permitir el reemplazo en el semillero de los cultivos infectados con una mayor rapidez, y asegurar que las plántulas están libres de *F. oxysporum* antes de su trasplante al campo, reduciendo de este modo la propagación del patógeno.

Como hemos comentado anteriormente, la aplicación de las técnicas moleculares en el control biológico no sólo se reduce a la monitorización de hongos antagonistas y fitopatógenos. La obtención de un ACB eficaz para su uso en el control de enfermedades no es fácil. La elección de estos agentes se realiza a menudo mediante análisis con medios microbiológicos clásicos, que en la mayoría de los casos no son suficientes, junto con experimentos en semillero en los que se prueban diferentes aislados, que resultan poco eficientes y tediosos (Montesinos y col., 2008). Una buena alternativa a estos métodos radica en el empleo de métodos bioquímicos y moleculares para el análisis y selección de aislados con elevada actividad de control biológico. En el Capítulo 4 de esta Tesis se analizaron 31 aislados del género *Trichoderma* obtenidos de diferentes fuentes naturales mediante la técnica de RAPD-PCR. Los distintos patrones de bandas obtenidos con esta técnica permitieron seleccionar e identificar cuatro especies diferentes de *Trichoderma*, y la elección de cinco aislados distintos de la especie *T. harzianum* para su estudio en profundidad. Se sabe que la eficacia de un aislado depende de numerosos factores, tales como su forma de inoculación o su persistencia en el

sustrato (Bernal-Vicente y col., 2009). Sin embargo, el potencial micoparasítico del aislado, basado principalmente en la síntesis de enzimas hidrolíticas es uno de los puntos clave en el control biológico (Verma y col., 2007). Numerosos autores han profundizado en el estudio de los genes relacionados con el micoparasitismo y las diferentes enzimas hidrolíticas que codifican (Geremía y col., 1993; De la Cruz y col., 1995; Flores y col., 1997; Steyaert y col., 2004), responsables no sólo de producir la hidrólisis de la pared celular del patógeno, si no también de activar la respuesta del hongo ante la presencia de un posible hospedador (Seidl y col., 2006). De este modo, en el Capítulo 4 de esta Tesis Doctoral se estudiaron los perfiles de expresión de seis de los genes que codifican para la síntesis de quitinasas (*exc1*, *exc2*, *chit42*, y *chit33*), glucanasas (*bgn13.1*) y proteasas (*prb1*), de los distintos aislados de *T. harzianum* en presencia de paredes celulares de *F. oxysporum*. Nuestros resultados mostraron que los patrones de expresión fueron diferentes dependiendo del aislado. Así, algunos de los aislados de *T. harzianum* ensayados mostraron mayores niveles de expresión de unos determinados genes frente a otros, como T-78 para los genes *chit42* y *chit33*, o T-30 para los genes *exc1* y *bgn13.1*. Por el contrario, algunos aislados seleccionados, como fue el caso de T-57, no expresaron alguno de los genes analizados, tales como *exc2*, *chit33* o *prb1*. Estos datos de expresión se relacionaron con las actividades enzimáticas hidrolíticas, donde también se observó que el potencial de síntesis de enzimas hidrolíticas puede variar enormemente de un aislado a otro. Ambos datos, de expresión de genes y actividad enzimática, se correlacionaron además con enfrentamientos en placa frente a *F. oxysporum*, donde no todos los aislados mostraron el mismo grado de micoparasitismo frente al patógeno, siendo los aislados T-30 y T-78 los que presentaron el mayor efecto. La eficacia del aislado T-78 frente a la fusariosis vascular ya ha sido mostrada en estudios previos por Bernal-Vicente y col. (2009) y López-Mondéjar y col. (2010). La selección de aislados naturales que presenten un elevado potencial evita el desarrollo de microorganismos modificados genéticamente, cuyo uso no está permitido en agricultura ecológica, no pudiendo emplearse en semillero bajo estas condiciones.

Las técnicas moleculares aplicadas al estudio de la expresión de genes importantes en biocontrol también se aplicaron en el Capítulo 5 de esta Tesis Doctoral. En este apartado se evaluó el efecto de tres residuos diferentes ricos en quitina, quitosano (CHIT), harina de camarón (SSP), y restos de champiñón (MW), sobre la expresión de distintos genes responsables de la actividad quitinolítica de *T. harzianum*, tanto quitinasa (*chit42*, *chit33*, y *chit37*) como NAGasa (*exc1* y *exc2*). Tanto la quitina como sus derivados y sus oligómeros (repeticiones de monómeros de N-acetilglucosamina más o menos deacetilada) son capaces de activar estos genes (Viterbo y col., 2002). Todas estas fuentes de quitina activaron la expresión de los genes chitinolíticos anteriormente expuestos, si bien los niveles de expresión dependieron del contenido en glucosamina de los diferentes residuos, alcanzándose los mayores niveles en los cultivos con CHIT seguido de SSP y MW. Los niveles de expresión de genes no estuvieron relacionados sin embargo con las actividades enzimáticas NAGasa y quitinasa medidas en los cultivos puros, lo cual se relacionó con el contenido en quitosano presente en algunos de estos residuos (CHIT y SSP). Se sabe que la carga positiva del quitosano puede provocar desde una inhibición del crecimiento del hongo hasta cambios estructurales en la pared celular y en la membrana del hongo que evite la excreción de enzimas al medio (Xu y col., 2007; Li y col., 2009) e incluso la inhibición de la síntesis proteica (Bautista-Baños y col., 2006). Esta inhibición no se encontró cuando el hongo creció en presencia de MW, debido a que el quitosano no suele encontrarse en la pared celular de los Basidiomicetos (Di Mario y col., 2008). Cuando los restos de quitina eran añadidos a la turba junto con *T. harzianum*, usándose como sustratos de crecimiento en semillero, la inhibición de la actividad quitinolítica no se observó. En estas condiciones, tanto los sustratos complementados con CHIT como con MW mostraron una elevada actividad quitinasa y NAGasa. Esto pudo deberse a que estos residuos favorecieron el desarrollo de microorganismos quitinolíticos, que degradaron el quitosano, reduciendo su efecto inhibitor del crecimiento de *T. harzianum*.

Los estudios moleculares, bioquímicos e *in vivo* con plántulas en semillero aplicados en este capítulo permitieron conocer mejor como afectan estos residuos a la actividad del ACB, y a su empleo frente al patógeno. La incorporación de estos

Discusión general

residuos junto a *T. harzianum* redujo las pérdidas de peso seco causadas por *F. oxysporum*, aunque estos compuestos no redujeron la cantidad de patógeno en el sustrato a diferencia de lo expuesto por otros autores (Rose y col., 2003; Ha y Huang, 2007). Este efecto se relacionó con el aumento de la actividad quitinolítica de los sustratos, si bien nuestros resultados sugirieron la presencia de otros posibles fenómenos como la inducción de resistencia en la planta por parte de *T. harzianum* (Howell, 2003) y por la presencia de quitina y sus oligómeros (Shibuya y Minami, 2001). Además, la incorporación de estos residuos mejoró el crecimiento de las plátulas de melón, debido fundamentalmente al alto contenido en macronutrientes, principalmente nitrógeno, de estos compuestos.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

IX. Conclusiones

Conclusiones

1. Los cebadores ITS1 S e ITS1 R, junto con la sonda *TaqMan* ITS1 TM Fam, diseñados en la región ITS1 de *T. harzianum* permitieron la detección y cuantificación específica de este hongo tanto en cultivos puros, como en muestras provenientes de sustratos orgánicos basados en turba y compost, mostrándose como una alternativa, rápida y eficaz a métodos clásicos de dilución en placa.
2. El empleo de la qRT-PCR basada en la cuantificación del ARNr de *T. harzianum* permitió cuantificar la cantidad de ACB activo en muestras de sustratos orgánicos como turba y compost. Las curvas de población activa de *T. harzianum* obtenidas mediante este sistema fueron totalmente diferentes a las obtenidas con qPCR y dilución en placa, mostrando como el ACB puede crecer y desarrollarse en los sustratos de crecimiento de semillero basados tanto en turba como en compost.
3. El uso de sustratos orgánicos de crecimiento basados en compost inoculado con *T. harzianum* ofreció mejores resultados que la turba inoculada con el ACB, mostrando mayor capacidad para reducir la infección por *F. oxysporum* y para disminuir la pérdida de peso provocada por este patógeno en plántulas de melón bajo condiciones de semillero.
4. El sistema *TaqMan* formado por los cebadores FOX S y FOX R, junto con la sonda FOX TM basados en un marcador SCAR permitió la detección específica de aislados de *F. oxysporum* potencialmente patógenos para varias especies de plantas de interés en horticultura. El empleo de este sistema para monitorizar *F. oxysporum* f. sp. *melonis* permitió detectar a este patógeno tanto en tejidos vegetales como en sustratos orgánicos (turba) usados en los semilleros. La cuantificación del patógeno con este sistema de PCR a tiempo real ofreció similares resultados que los métodos de cultivo en placa con

Conclusiones

medios selectivos, ofreciendo sin embargo mayor rapidez, en menos de 48 h, en la detección del patógeno.

5. Los perfiles generados mediante RAPD-PCR permitieron agrupar los diversos aislados de *Trichoderma* usados en esta Tesis en cuatro especies diferentes, la detección de los aislados duplicados y la selección de cinco aislados diferentes de *T. harzianum*. Los patrones de expresión de los genes relacionados con el micoparasitismo (*exc1*, *exc2*, *chit42*, *chit33*, *prb1*, y *bgn13.1*) y de las actividades hidrolíticas fueron diferentes según el aislado seleccionado ensayado. Los aislados con mayor actividad quitinasa, NAGasa y β -1,3-glucanasa, T-30 y T-78, mostraron también la mayor capacidad micoparasítica frente a *F. oxysporum* en los enfrentamientos en placa.
6. El empleo de residuos ricos en quitina activó la expresión de los genes *exc1*, *exc2*, *chit42*, *chit33* y *chit37*, responsables de la actividad quitinolítica de *T. harzianum in vitro*, si bien la composición de alguno de estos residuos pudo inhibir la secreción de enzimas quitinolíticas por parte del hongo en estas condiciones. El uso de estos residuos en condiciones *in vivo* disipó este posible efecto inhibitor, aumentando la actividad NAGasa y quitinasa de los sustratos durante el crecimiento de la planta. Esta mayor actividad quitinolítica se relacionó con una menor efecto del patógeno *F. oxysporum* en las plántulas, que mantuvieron un peso mayor respecto a los tratamientos no inoculados con *T. harzianum*.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

X. Resumen

Resumen

El control biológico de fitopatógenos es una alternativa viable para sustituir el empleo de productos químicos en agricultura. Esta medida cobra gran importancia en el campo de la agricultura ecológica, donde el uso de estos productos químicos está prohibido por la regulación europea, provocando que estos cultivos sean especialmente sensibles a diferentes patógenos. Uno de estos patógenos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, agente causal de la fusariosis vascular del melón, es el principal responsable de enormes pérdidas tanto a nivel de campo como durante la producción de plántula en semilleros. El problema de esta enfermedad en semillero es si cabe aún más importante, ya que estas instalaciones presentan las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad y dispersión del patógeno, así como la posibilidad de su traslado al campo, favoreciendo de este modo que la enfermedad se extienda.

El empleo del hongo *Trichoderma harzianum* ha mostrado buenos resultados como agente de control biológico (ACB) contra este fitopatógeno a nivel de semillero. La actividad de control biológico que presentan los aislados de esta especie es debido principalmente a los distintos mecanismos de acción que presentan, tales como antibiosis y competencia por nutrientes, caracterizándose además por producir una gran batería de enzimas hidrolíticas que les permite actuar como micoparásitos de otros hongos.

El empleo de estos aislados requiere sin embargo de herramientas que permitan no sólo la selección de aislados con un mayor potencial de control biológico o una mayor efectividad frente a una enfermedad, si no también de herramientas que permitan la monitorización del ACB una vez inoculado en los sustratos orgánicos para el crecimiento de plántulas en semillero. A su vez, la aplicación y desarrollo de estas herramientas para la rápida detección del patógeno mejoraría enormemente el control de la enfermedad, reduciendo las posibles pérdidas y la expansión de la misma.

En los últimos años, el desarrollo de los métodos moleculares basados en el ADN y la PCR han ofrecido numerosas herramientas para el estudio en profundidad tanto de los hongos antagonistas como de los fitopatógenos. De entre estas técnicas destaca la PCR a tiempo real, la cual ofrece buenas alternativas al empleo de otros métodos clásicos como el cultivo en placa o la microscopía a la hora de monitorizar y estudiar el uso del ACB.

Es por ello que el objetivo de estas **Tesis Doctoral** fue aplicar y desarrollar estas herramientas moleculares en el empleo de *T. harzianum* en el control de la fusariosis vascular del melón en semillero. Para ello, la Tesis se ha estructurado en dos partes: la primera, que incluye los capítulos 1, 2 y 3, centrada en la detección y cuantificación tanto del ACB como del fitopatógeno; y una segunda parte, que incluye los capítulos 4 y 5, centrada en el estudio de los mecanismos biocontrol de este ACB frente al patógeno:

- Capítulo 1. López-Mondéjar R, Anton A, Raidl S, Ros M, Pascual JA, 2010. Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass. *Bioresource Technology* 101, 2888-2891
- Capítulo 2. Beaulieu R, López-Mondéjar R, Tittarelli F, Ros M, Pascual JA, 2011. qRT-PCR quantification of the biological control agent *Trichoderma harzianum* in peat and compost-based growing media. *Bioresource Technology* 102, 2793-2798.
- Capítulo 3. López-Mondéjar R, Beaulieu R, Ros M, Pascual JA, 2011. SCAR-based real-time PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions. En revisión.
- Capítulo 4. López-Mondéjar R, Ros M, Pascual JA, 2011. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control* 56, 59-66.

Capítulo 5. López-Mondéjar R, Blaya J, Ros M, Pascual JA, 2011. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *in vitro* and greenhouse nursery experiments. En revisión.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral ofrecieron un sistema molecular basado en un par de cebadores y en una sonda *TaqMan* para la detección y cuantificación específica de *T. harzianum* mediante PCR a tiempo real, tanto en cultivos puros como en sustratos orgánicos en semillero. Además, este sistema se utilizó para cuantificar la cantidad de ACB activo en el sustrato, mediante qRT-PCR. Los resultados obtenidos ofrecieron una curva de población totalmente diferente a la conseguida con qPCR y/o cultivo en placa, mostrando como este hongo fue capaz de desarrollarse en los medios de crecimiento de plántula bajo condiciones de semillero.

El empleo de compost inoculados con *T. harzianum* mostró también mejores resultados en el control de la enfermedad que el uso de turbas inoculadas con este ACB, reduciéndose la pérdida de peso y la infección por parte del patógeno. Estos resultados confirmaron que los sustratos basados en compost pueden ser buenas alternativas para controlar la fusariosis vascular del melón a nivel de semillero.

Los resultados de esta Tesis incluyeron además el desarrollo de un sistema *TaqMan* para detectar y cuantificar *F. oxysporum* mediante PCR a tiempo real bajo condiciones de semillero. Este sistema permitió la detección del hongo en tejidos de la planta en los primeros estados de la infección, cuando aún no se observaban síntomas, así como la detección y cuantificación del patógeno en el sustrato. Este sistema ofreció mayor sensibilidad y rapidez, en menos de 48 h, que los métodos clásicos de cultivo en placa.

El empleo de herramientas moleculares basadas en el estudio de perfiles de amplificación del ADN (RAPD-PCR) y el estudio de expresión de genes relacionados con el proceso de micoparasitismo (qRT-PCR), junto al estudio de actividades enzimáticas codificadas por estos genes y observaciones en placa, permitió seleccionar aislados de *T. harzianum* con un alto potencial biocontrol frente al

patógeno *F. oxysporum*. La presencia de paredes celulares del patógeno activó la expresión de estos genes, siendo su perfil de expresión diferente según cada aislado. Los aislados de *T. harzianum* T-30 y T-78, que presentaron mayor actividad quitinasa, NAGasa y β -1,3-glucanasa, mostraron también el mayor grado de micoparasitismo cuando fueron enfrentados en placa con el patógeno.

El estudio de los perfiles de expresión de los genes relacionados con el efecto biocontrol de *T. harzianum* permitió también evaluar la respuesta del sistema quitinolítico de este hongo frente a tres residuos ricos en quitina. El uso tanto de quitosano, como de harina de camarón y restos de champiñón, activaron los genes responsables de la actividad quitinolítica de este hongo. Además, nuestros resultados mostraron que el posible efecto inhibitor de algunas de estas sustancias se disipaba cuando se utilizaron como complementos de la turba en experimentos en semillero. Bajo estas condiciones de semillero, la presencia de *T. harzianum* y de estos compuestos aumentó la actividad quitinolítica (quitinasa y NAGasa) de los sustratos, lo cual se relacionó con un menor efecto del patógeno en las plantas, que presentaban un mayor mantenimiento del peso seco en presencia del patógeno. Además, se demostró que pequeñas cantidades de estos compuestos ricos en quitina adicionadas a turbas inoculadas con *T. harzianum* mejoraban el crecimiento de las plántulas debido a su aporte nutricional, ofreciendo por tanto un valor añadido para estos residuos en el campo de la agricultura.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

XI. Summary

Summary

The biological control of fungal phytopathogens has emerged as an efficient and nature-friendly alternative to substitute the use of chemical products in agriculture. This measure is of great importance in the field of organic farming, where the use of these chemicals (pesticides and fungicides) is banned by European regulation, making these crops particularly sensitive to different pathogens. One of these pathogens, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, causal agent of Fusarium wilt of melon, is primarily responsible for huge losses at both the field and during the production of seedlings in nurseries. The problem of this disease in the greenhouse nursery is even more important, since these facilities have the optimal conditions for disease development and spread of the pathogen, and the possibility of transfer to the field, thus favoring the disease spread.

The use of isolates of the fungus *Trichoderma harzianum* has shown good results as a biological control agent (BCA) against this phytopathogen at greenhouse nursery level. The biocontrol effect of these isolates is due to several mechanisms of action, such as antibiotic production, nutrient and space competition, and the secretion of a large battery of hydrolytic enzymes that allow them to act as a mycoparasite of phytopathogens.

The application of these BCA, however, requires effective tools that allow not only the selection of isolates with the highest biocontrol potential or the highest effectiveness against the disease, but also of tools that allow the monitoring of this BCA once inoculated into organic substrates for the growth of seedlings in greenhouse nurseries. In turn, the implementation and development of these tools for rapid detection of the phytopathogen greatly improve the control of the disease, reducing the potential losses and the spread of the disease.

The development of molecular methods based in DNA and PCR during the last decades has provided powerful tools for in-depth study of both antagonistic fungi as phytopathogen. Among all these techniques, the real-time PCR stands as a good

Summary

alternative to the use of other conventional methods such as plate culture or microscopy for monitoring and study of the use of BCAs.

In this context, the aim of this Doctoral Thesis focused on applying and developing these molecular tools in the use of *T. harzianum* in controlling Fusarium wilt of melon seedlings. To this end, the thesis was structured in two parts: the first, which includes Chapters 1, 2 and 3, focused on the detection and quantification both BCA and the phytopathogen; and a second part, comprising Chapters 4 and 5, focused on the study of biocontrol mechanisms of *T. harzianum* against the pathogen *F. oxysporum*:

- Chapter 1. López-Mondéjar R, Anton A, Raidl S, Ros M, Pascual JA, 2010. Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass. *Bioresource Technology* 101, 2888-2891
- Chapter 2. Beaulieu R, López-Mondéjar R, Tittarelli F, Ros M, Pascual JA, 2011. qRT-PCR quantification of the biological control agent *Trichoderma harzianum* in peat and compost-based growing media. *Bioresource Technology* 102, 2793-2798.
- Chapter 3. López-Mondéjar R, Beaulieu R, Ros M, Pascual JA, 2011. SCAR-based real-time PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions. Under review.
- Chapter 4. López-Mondéjar R, Ros M, Pascual JA, 2011. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control* 56, 59-66.
- Chapter 5. López-Mondéjar R, Blaya J, Ros M, Pascual JA, 2011. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *in vitro* and greenhouse nursery experiments. Under review.

The results in this thesis provided a molecular system based on primers and TaqMan probe for specific detection and quantification of *T. harzianum* by real-time PCR, both in pure cultures as organic substrates in the greenhouse nursery. Moreover, the use of this system to quantify the amount of active *T. harzianum* in the substrate, by qRT-PCR, gave a completely different population curve to that achieved with real-time PCR (qPCR) and / or plate culture, showing how this fungus was able to grow in seedlings growth media under greenhouse nursery conditions.

The use of compost inoculated with *T. harzianum* also showed better results in controlling the disease than the use of peat inoculated with the BCA, reducing weight loss and infection by the pathogen. These results confirmed that compost-based growing media can be good alternatives for controlling Fusarium wilt of melon seedling at greenhouse nursery level.

The results of this thesis also included developing a TaqMan system to detect and quantify *F. oxysporum* by real-time PCR under greenhouse nursery conditions. This system allowed the detection of the fungus in plant tissues in the early stages of infection when no symptoms are observed, and the detection and quantification of the pathogen in the substrate of melon seedlings. This system offered greater sensitivity and speed, in less than 48 h, than the classical methods of plate culture.

The use of molecular techniques based on the study of DNA amplification profiles (RAPD-PCR) and the study of gene expression related to the process of mycoparasitism (qRT-PCR), together with the study of enzymatic activities encoded by these genes and dual plate confrontation assays, allowed to select isolates of *T. harzianum* with high biocontrol potential against the pathogen *F. oxysporum*. The presence of the pathogen cell walls triggered the expression of these genes, their expression profile being different for each isolated. The isolates T-30 and T-78, which showed higher chitinase activity, N-acetylglucosaminidase and β -1,3-glucanase also showed the highest degree of mycoparasitism when they were confronted with the pathogen on plate.

The study of the expression profiles of genes related to the biocontrol effect of *T. harzianum* also allowed evaluating the response of the chitinolytic system of this

Summary

fungus against three chitin-rich residues. The use of both chitosan and shrimp meal and mushroom wastes activated the expression of the genes involved in the chitinolytic activity of this fungus. Moreover, our results showed that the possible inhibitory effect of some of these substances was dissipated when were used as complements of peat in experiments under greenhouse nursery conditions. Under these *in vivo* conditions, the presence of *T. harzianum* and these residues increased the chitinolytic activity (chitinase and N-acetylglucosaminidase) of the seedling substrates, which was associated with a lower effect of the pathogen in plants that had a higher dry weight maintenance in the presence of the *F. oxysporum*. The results of this thesis also showed that small amounts of these compounds rich in chitin added to peat inoculated with *T. harzianum* improved the seedling growth due to its nutritional value, thereby offering added value for these residues in the field of agriculture.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

XII. Bibliografía

Bibliografía

- Abdel-Fattah GM, Shabana YM, Ismail AE, Rashad YM, 2007. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae* Mycopathologia 164:81–9.
- Aerts R, De Schutter B, Rombouts L, 2002. Suppression of *Pythium* spp. by *Trichoderma* spp. during germination of tomato seeds in soilless growing media. Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet. 67:343–51.
- Agrios GN, 2005. Plant Pathology. Academic press, NY, pp. 952.
- Alabouvette C, Olivain C, Steinberg C, 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. European Journal of Plant Pathology 114:329–341.
- Alfano G, Lewis Ivey ML, Cakir C, Bos JIB, Miller, SA, Madden LV, Kamoun S, Hoitink HAJ, 2007. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. Phytopathology 97:429–437.
- Al-Sadi AM, Al-Said FA, Al-Jabri AH, Al-Mahmooli IH, Al-Hinai AH, de Cock AWAM, 2011. Occurrence and characterization of fungi and oomycetes transmitted via potting mixtures and organic manures. Crop Protection 30:38–44.
- Amer MA, Abou-El-Seoud II, 2008. Mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* as biocontrol agents for suppression of *Rhizoctonia solani* damping-off disease of tomato. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 73:217–32
- Anderson IC, Parkin PI, 2007. Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. Journal of Microbiological Methods 68:248–253.
- Atkins SD, Clark IM, Sosnowska D, Hirsch PR, Kerry BR, 2003. Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real-time PCR, selective media, and baiting. Applied and Environmental Microbiology 69:4788–4793.
- Atkins SD, Clark IM, Pande S, Hirsch PR, Kerry BR, 2005. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiology Ecology 51:257–264.
- Atkins SD, Clark IM, 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. Journal of Applied Genetics 45:3–15.
- Atallah ZK, Bae J, Jansky SH, Rouse DI, Stevenson WR, 2007. Multiplex real-time quantitative PCR to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in

Bibliografía

- potato lines that differ in response to *Verticillium* wilt. *Phytopathology* 97:865–872.
- Baayen RP, 2000. Diagnosis and detection of host-specific forms of *Fusarium oxysporum*. *EPPO Bulletin* 30:489–491.
- Bailey BA, Lumsden RD, 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: Harman GE, Kubicek CP (eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 185–204.
- Batta YA, 2007. Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Postharvest Biology and Technology* 43:143–150.
- Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-del Valle MG, Hernández-López M, Ait Barka E, Bosquez-Molina E, Wilson CL, 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25:108–118.
- Bengtsson M, Karlsson HJ, Westman G, Kubista M, 2003. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 31:e45.
- Benveniste O, Vaslin B, Villinger F, Grand RL, Ansari AA, Dormont D, 1996. Cytokine mRNA levels in unmanipulated (ex vivo) and in vitro stimulated monkey PBMCs using a semiquantitative RT-PCR and a high sensitivity fluorescence-based detection strategy. *Cytokine* 8:32–41.
- Bermingham S, Dewey FM, Maltby L, 1995. Development of a Monoclonal Antibody-Based Immunoassay for the Detection and Quantification of *Anguillospora longissima* Colonizing Leaf Material. *Applied and Environmental Microbiology* 7: 2606–2613.
- Bernal-Vicente A, Ros M, Pascual JA, 2009. Increased effectiveness of the *Trichoderma harzianum* isolate T-78 against *Fusarium* wilt on melon plants under nursery conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89:827–833.
- Bernal-Vicente A, Ros M, Tittarelli F, Intrigliolo F, Pascual JA, 2008. Citrus compost and its water extract for cultivation of melon plants in greenhouse nurseries. Evaluation of nutritive and biocontrol effects. *Bioresource Technology* 99:8722–8728.
- Blancard D, Lecoq H, Pitrat M, 1991. Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar, luchar. Ed. Multiprensa, Madrid, Spain, pp. 301.

- Bridge P, Spooner B, 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil* 232:147–154.
- Brotman Y, Kapuganti JG, Viterbo A, 2010. *Trichoderma*. *Current Biology* 20:R390–R391.
- Chaverri P, Castlebury LA, Samuels GJ, Geiser DM, 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixxi* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:302–313.
- Chaverri P, Samuels GJ, Stewart EL, 2001. *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia* 93:1113–1124.
- Chet I, 1987. *Trichoderma* – application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. En: Chet I (ed.), *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. John Wiley and Sons, New York, pp. 147–160.
- Chet I, Benhamou N, Haran S, 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Cook R, Baker KF, 1983. *The Nature and Practise of Biological Control of Plant Pathogens*. American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, pp. 539.
- Chilvers MI, du Toit LJ, Akamatsu H, Peever TL, 2007. A real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. *Plant Disease* 91:599–608.
- Cook RJ, Baker KF, 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, pp. 539.
- Cordier C, Edel-Hermann V, Martin-Laurent F, Blal B, Steinberg C, Alabouvette C, 2007. SCAR-based real-time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *Journal of Microbiological Methods* 68:60–68.
- Cotxarrera L, Trillas-Gay MI, Steinberg C, Alavouvette C, 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry* 34:467–476.
- Coventry E, Noble R, Mead A, Marin FR, Pérez JA, Whipps JM, 2006. Allium white rot suppression with compost and *Trichoderma viride* in relation to sclerotia viability. *Biological Control* 96:1009–1020.
- Dauch AL, Watson AK, Jabaji-Hare AH, 2003. Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers. *Journal of Microbiological Methods* 55:51–64.

Bibliografía

- De Ceuster TJJ, Hoitink HAJ, 1999. Prospects for composts and biocontrol agents as substitutes for methyl bromide in biological control of plant diseases. *Compost Science and Utilization* 7:6–15.
- De la Cruz, J., Pintor-Toro, J.A., Benítez, T., Llobell, A., Roero, L.A., 1995. Novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* 177:6937-6945.
- Di Marco SE, Osti F, 2007. Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeomoniella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 46:73–83.
- Di Mario, F., Rapanà, P., Tomati, U., Galli, E., 2008. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules* 43:8–12.
- Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de marzo de 2001 sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, L106 del 17 de abril de 2001.
- Djajakirana G, Joergensen RG, Meyer B, 1996. Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22:299–304.
- Dodd SL, Robert A. Hill RA, Stewart A, 2004. A duplex-PCR bioassay to detect a *Trichoderma virens* biocontrol isolate in non-sterile soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1955–1965.
- Dodd SL, Lieckfeldt E, Samuels GJ, 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95:27–40.
- Druzhinina IS, Kopchinski A, Kubicek CP, 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47:55–64.
- Druzhinina IS, Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Mulaw TB, Bisset J, 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology* 10:94.
- Elad Y, 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19:709–714.
- El-Hamouchi A, Bajji M, Friel D, Najimi B, Achbani EH, Jaafari SE, Durieux A, Jijakli MH, 2008. Development of SCAR markers and a semi-selective medium for the quantification of strains Ach 1-1 and 1113-5, two *Aureobasidium pullulans* potential biocontrol agents. *Postharvest Biology and Technology* 50:216–223.

- El-Mohamedy RSR, Ziedan EH, Abdalla AM, 2010. Biological soil treatment with *Trichoderma harzianum* to control root rot disease of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in newly reclaimed lands in Nobarria province. Archives of Phytopathology and Plant Protection 43:73–87.
- Ekblad A, Wallander H, Näsholm T, 1997. Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. New Phytologist 138:143–149.
- Faize M, Malnoy M, Dupuis F, Chevalier M, Parisi L, Chevreau E, 2003. Chitinases of *Trichoderma atroviride* Induce Scab Resistance and Some Metabolic Changes in Two Cultivars of Apple. Phytopathology 90:1496–1504.
- FAOSTAT, 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/> (31 de mayo de 2011).
- Filion M, St-Arnaud M, Jabai-Hare SH, 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. Journal of Microbiological Methods 53:67–76.
- Fiume F, Fiume G, 2006. Biological control of *Botrytis* gray mould on tomato cultivated in greenhouse. Communications in agricultural and applied biological sciences 71: 897–908.
- Flores A, Chet I, Herrera-Estrella A, 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. Current Genetics 31:30–37.
- Fournier A, Enkerli J, Keller S, Widmer F, 2008. A PCR-based tool for the cultivation-independent monitoring of *Pandora neoaphidis*. Journal of Invertebrate Pathology 99:49–56.
- Ganassi S, Moretti A, Stornelli C, Fratello B, Pagliai AMB, Logrieco A, Sabatini MA, 2000. Effect of *Fusarium*, *Paecilomyces* and *Trichoderma* formulations against aphid *Schizaphis graminum*. Mycopathologia 151:131–138.
- Geremia, R.A., Goldman, G.H., Jacobs, D., Aviles, W., Vila, S.B., Van Montagu, M., Herrera-Estrella, A., 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Molecular Microbiology 8:603–613.
- Gómez J, Tello JC, 2000a. Presencia de la raza 1-2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* en Almería. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 26:27–33.
- Gómez J, Tello JC, 2000b. Las semillas de melón (*Cucumis melo* L.) portadoras de diversos patotipos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 26:35–45.

Bibliografía

- Grams W, Meyer W, 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum* Rifai?. *Mycologia* 90:904–915.
- Gruber S, Vaaje-Kolstad G, Matarese F, López-Mondéjar R, Kubicek CP, Seidl-Seiboth V, 2011. Analysis of subgroup C of fungal chitinase containing chitin-binding and LysM modules in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. *Glycobiology* 21:122–133.
- Ha MT, Huang JW, 2007. Control of *Fusarium* wilt of asparagus bean by organic soil amendment and microorganisms. *Plant Pathology Bulletin* 16:169–180.
- Hagn A, Wallisch S, Radl V, Munch JC, Schlöeter M, 2007. A new cultivator independent approach to detect and monitor common *Trichoderma* species in soil. *Journal of Microbiological Methods* 69:86–92.
- Harman GE, Petzoldt R, Comis A, Chen J, 2004. Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94:147–53.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986–994.
- Heremans B, Demeulenaere S, Haesaert G, 2005. Suppression of *Fusarium* wilt by combining green compost and *Trichoderma hamatum*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 70:181–4.
- Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Díaz-Mínguez JM, Castro C, Monte E, García-Acha I, 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1890–1898.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R, 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026–1030.
- Hjeljord L, Tronsmo A, 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En: Harman GE, Kubicek CP (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 131–152.
- Hogg AC, Johnston RH, Dyer AT, 2007. Applying real-time quantitative PCR to *Fusarium* crown rot of wheat. *Plant Disease* 91:1021–1028.
- Hoitink HAJ, Stone AG, Han DY, 1997. Supresión de enfermedades de plantas mediante compost. *Agronomía Costarricense* 21:25–33.

- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH, 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 88: 7276–7280.
- Horst LE, Locke J, Krause CR, McMahon RW, Madden LV, Hoitink HAJ, 2005. Suppression of Botrytis blight of begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost-amended potting mixes. Plant Disease 89:1195–1200.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: 4–10.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A, 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes and Immunity 6:279–284.
- Inami K, Yoshioka C, Hirano Y, Kawabe M, Tsushima S, Teraoka T, Arie T, 2010. Real-time PCR for differential determination of the tomato wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and its races. Journal of General Plant Pathology 76:116–121.
- Index Fungorum Partnership, 2008. <http://www.indexfungorum.org/> (31 de mayo de 2011).
- Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H, Yamasgishi H, Iwasaki S, Mitoma Y, 1995. Homogenous qualitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. Analytical Biochemistry 229: 207–213.
- Jiménez-Fernández D, Montes-Borrego M, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM, Landa BB, 2010. Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. Applied Soil Ecology 46:372–382.
- Karpovich-Tate N, Spanu P, Dewey FM, 1998. Use of monoclonal antibodies to determine biomass of *Cladosporium fulvum* in infected tomato leaves. Molecular Plant-Microbe Interactions 7:710–716.
- Khan J, Ooka JJ, Miller SA, Madden LV, Hoitink HAJ, 2004. Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against *Phytophthora* crown rot and leaf blight. Plant Disease 88:280–286.
- Kim DH, Martyn RD, Magill CW, 1993. Mitochondrial DNA (mtdna)-relatedness among *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* in the Cucurbitaceae. Phytopathology 83:91–97.

Bibliografía

- Kim TG, Knudsen GR, 2008. Quantitative real-time PCR effectively detects and quantifies colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. *Applied soil ecology* 40:100–108.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, Gams W, Börner T, Kubicek CP, 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *PNAS* 93:7755–7760.
- Lahlali R, Hijri M, 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiology Letters* 311:152–159.
- Lammerts van Bueren ET, Struik PC, Jacobsen E, 2003. Organic propagation of seed and planting material: an overview of problems and challenges for research. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* 51:263–277.
- Lammerts van Bueren ET, Jones SS, Tamm L, Murphy KM, Myers JR, Leifert C, Messmer MM, 2010. The need to breed crop varieties suitable for organic farming, using wheat, tomato and broccoli as examples: a review. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, doi:10.1016/j.njas.2010.04.001.
- Lee TO, Khan Z, Kim SG, Kim YH, 2008. Amendment with peony root bark improves the biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18:1537–43.
- Lees AK, Culles DW, Sullivan L, Nicolson MJ, 2002. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology* 103:73–83.
- Li GQ, Huang HC, Acharya SN, Erickson RS, 2005. Effectiveness of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma atroviride* in suppression of sclerotinia blossom blight of alfalfa. *Plant Pathology* 54:204–211.
- Li S, Hartman GL, Domier LL, Boykin D, 2008. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* isolates in soybean roots by colony-forming unit assays and real-time quantitative PCR. *Theoretical and Applied Genetics* 117:343–352.
- Lievens B, Brouwer M, Vanachter ACRC, Cammue BPA, Thomma BPHJ, 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science* 171:155–165.
- Lievens B, Claes L, Vakalounakis DJ, Vanachter ACRC, Thomma BPHJ, 2007. A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Environmental Microbiology* 9:2145–2161.

- Lin YH, Chen KS, Chang JY, Wan YL, Hsu CC, Huang JW, Chang PFL, 2010. Development of the molecular methods for rapid detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in Taiwan. *New Biotechnology* 27:409–418.
- Livak KJ, Flood JA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K, 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR products and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* 4:357–362.
- Lo CT, Nelson EB, Hayes CK, Harman GE, 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology* 88:129–136.
- Longa, C.M.O., Savazzini, F., Tosi, S., Elad, Y., Pertot, I., 2009. Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. *Journal of Applied Microbiology* 106:1549–1557.
- López-Mondéjar R, Bernal-Vicente A, Ros M, Tittarelli F, Canali S, Intrigliolo F, Pascual JA, 2010. Utilisation of citrus compost-based growing media amended with *Trichoderma harzianum* T-78 in *Cucumis melo* L. seedling production. *Bioresource Technology* 101:3718–23.
- MAPA, 2010. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, <http://www.mapa.es/es/agricultura/agricultura.htm> (31 de mayo de 2011).
- Marcello CM, Steindorff AS, Petrofeza da Silva S, do Nascimento Silva R, Mendes Bataus LA, Ulhoa CJ, 2010. Expression analysis of the exo-b-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research* 165:75–81.
- Maroto J, 1994. El cultivo de las cucurbitáceas en España. En: Díaz JR, García-Jiménez J (eds), *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías de la Sociedad española de Fitopatología, Agropubli S.L., Phytoma-España, pp. 15–19.
- Martyn RD, Gordon TR, 1996. Fusarium wilt of melon. En: Zitter TA, Hopkins DA, Thomas CH (eds), *Compendium of cucurbit diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, pp. 14–15.
- Massart S, Jijakli HM, 2007. Use of molecular techniques to elucidate the reviews mechanisms of action of fungal biocontrol agents: a review. *Journal of Microbiological Methods* 69:229–241.

Bibliografía

- McCartney HA, Foster SJ, Fraaije BA, Ward E, 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59: 129–142.
- Mendoza-Mendoza A, Pozo MJ, Grzegorski D, Martínez P, García JM, Olmedo-Monfil V, Cortés C, Kenerley C, Herrera-Estrella A, 2003. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. *PNAS* 100:15965–15970.
- Menendez AB, Godeas A. 1998. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma harzianum*. *Mycopathologia* 142:153–60.
- Montesinos E, Badosa E, Bonaterra A, Peñalver R, López MM, 2008. Aplicación de la biotecnología al control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos. En: Pallás V, Escobar C, Rodríguez Palenzuela P, Marcos JF (eds.), *Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 345–368.
- Morrison TM, Weis JJ, Wittwer CT, 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24: 954–962.
- Mousseaux MR, Dumroese RK, James RI, Wenny DI, Knudsen GR, 1998. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biological control of *Fusarium oxysporum* in container-grown Douglas-fir seedlings. *New Forests* 15:11–21.
- Okubara PA, Schroeder KL, Paulitz TC, 2008. Identification and quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 98:837–847.
- Pasquali M, Piatti P, Gullino ML, Garibaldi A, 2006. Development of a Real-time Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from Basil Seed and Roots. *Journal of Phytopathology* 154:632–636.
- Plasencia J, Jemmerson R, Bantari EE, 1996. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Verticillium dahliae* and development of a quantitative immunoassay for fungal biomass. *Phytopathology* 86:170–176.
- Postma J, Montanari M, van den Boogert PHJF, 2003. Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost. *European Journal of Soil Biology* 39:157–163.
- Pucher ME, Steiger MG, Mach RM, Mach-Aigner AR, 2010. A modified expression of the major hydrolase activator in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) changes enzymatic catalysis of biopolymer degradation. *Catalysis Today*, doi:10.1016/j.cattod.2010.12.038.

- Rabeendrana N, Jonesa EE, Mootb DJ, Stewart A, 2006. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. *Biological Control* 39:352–362.
- Raidl S, Bonfigli R, Agerer R, 2005. Calibration of quantitative real-time TaqMan PCR by correlation with hyphal biomass and ITS copies in mycelia of *Piloderma croceum*. *Plant Biology* 7:713–717.
- Reglamento (CE) No 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L268 del 18 de octubre de 2003.
- Reglamento (CE) No 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 22 de septiembre de 2003 relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos, y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L268 del 18 de octubre de 2003.
- Reglamento (CE) No 65/2004 de la Comisión de 14 de enero de 2004 por el que se establece un sistema de creación y asignación de identificadores únicos a los organismos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L10 del 16 de enero de 2004.
- Reglamento (CE) No 641/2004 de la Comisión de 6 de abril de 2004 sobre las normas de desarrollo del Reglamento (CE) no 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la solicitud de autorización de nuevos alimentos y piensos modificados genéticamente, la notificación de productos existentes y la presencia accidental o técnicamente inevitable de material modificado genéticamente cuya evaluación de riesgo haya sido favorable. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L102 del 7 de abril de 2004.
- Reglamento (CE) No 834/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos por el que se deroga el Reglamento (CEE) No 2092/91. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L189 del 20 de julio de 2007.
- Reithner B, Schuhmacher R, Stoppacher N, Pucher M, Brunner K, Zeilinger S, 2007. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genetics and Biology* 44:1123–1133.
- Ricárdez-Salinas M, Huitrón-Ramírez MV, Tello-Marquina JC, Camacho-Ferre F, 2010. Planting density for grafted melon as an alternative to methyl bromide use in Mexico. *Scientia Horticulturae* 126:236–241.

Bibliografía

- Rincón AM, Codón AC, Benítez T, 2008. Hidrolasas y genes fúngicos de interés en biocontrol. En: Pallás V, Escobar C, Rodríguez Palenzuela P, Marcos JF (eds.), Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 345–368.
- Ros M, Hernández MT, García C, Bernal A, Pascual JA, 2005. Biopesticide effect of green compost against *Fusarium* wilt on melon plants. *Journal of Applied Microbiology* 98:845–854.
- Rose S, Parker M, Punja ZK, 2003. Efficacy of biological and chemical treatments for control of *Fusarium* root and stem rot on greenhouse cucumber. *Plant Disease* 87:1462–1470.
- Rubio MB, Hermosa MR, Keck E, Monte E, 2005. Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial Ecology* 49:25–33.
- Sahebani N, Hadavi N, 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2016–2020.
- Sant D, Casanova E, Segarra G, Avilés M, Reis M, Trillas MI, 2010. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T-34 on *Fusarium* wilt and water usage in carnation Brown on compost-based growth medium. *Biological Control* 53:291–296.
- Sarlin T, Yli-Mattila T, Jestoi M, Rizzo A, Paavanen-Huhtala S, Haikara A, 2006. Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. *European Journal of Plant Pathology* 114:371–380.
- Savazzini F, Longa CMO, Pertota I, 2008. Impact of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 on soil microbial communities of a vineyard in northern Italy. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1457–1465.
- Sayler RJ, Yang Y, 2007. Detection and quantification of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the rice sheath blight pathogen, in rice using real-time PCR. *Plant Disease* 91:1663–1668.
- Schena L, Nigro F, Ippolito A, Gallitelli D, 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110:893–908.
- Schroeder KL, Okubara PA, Tambong JT, Lévesque CA, Paulitz TC, 2006. Identification and quantification of pathogenic *Pythium* spp. from soils in eastern Washington using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 96:637–647.

- Schubert R, Raidl S, Funk R, Bahnweg G, Müller-Starck G, Agerer R, 2003. Quantitative detection of agar-cultivated and rhizotron-grown *Piloderma croceum* Erikss. & Hjortst. by ITS1-based fluorescent PCR. *Mycorrhiza* 13: 159–65.
- Schuster A, Schmoll M, 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:787–799.
- Segarra G, Casanova E, Avilés M, Trillas I, 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology* 59:141–149.
- Seidl V, Druzhinina IS, Kubicek CP, 2006. A screening system for carbon sources enhancing β -N-acetylglucosaminidase formation in *Hypocrea atroviridis* (*Trichoderma atroviride*). *Microbiology* 152:2003–2012.
- Shibuya, N., Minami, E., 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:223–233.
- Shoresh M, Harman GE, Mastouri F, 2010. Induced Systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* 48:21–434.
- Siddiqui Y, Meon S, Ismail MR, Ali A, 2008. *Trichoderma*-fortified compost extracts for the control of *Choanephora* wet rot in okra production. *Crop Protection* 27:385–390.
- Singer JW, Malone RW, Tomer MD, Meade TG, Welch J, 2006. Compost effect on water retention and native plant establishment on a construction embankment. *Journal of Soil and Water Conservation* 61:268–273.
- Sivan A, Chet I, 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79:198–203.
- Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En: Harman GE, Kubicek CP (eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 139–191.
- Smith CJ, Osborn AM, 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 67:6–20.
- Soriano-Martín ML, Porrás-Piedra A, Porrás-Soriano A, 2006. Use of microwaves in the prevention of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* infection during the commercial production of melon plantlets. *Crop Protection* 25:52–57.

Bibliografía

- Steyaert JM, Stewart A, Jaspers M, Carpenter M, Ridgway HJ, 2004. Co-expression of two genes, a chitinase (*chit42*) and a proteinase (*prb1*), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. *Mycology* 96:1245–1252.
- Strashnov Y., Elad Y, Sivan A., Rudich Y. and Chet I. 1985. Control of *Rhizoctonia solani* fruit rot of tomatoes by *Trichoderma harzianum* Rifai. *Crop Protection* 4: 359–364.
- Suárez-Estrella F, Vargas-García MC, Elorrieta MA, López MJ, Moreno J, 2003. Temperature effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* survival during horticultural waste composting. *Journal of Applied Microbiology* 94:475–482.
- Suárez-Estrella F, Vargas-García MC, López MJ, Moreno J, 2004. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* on plant waste. *Crop Protection* 23:127–133.
- Suárez-Estrella F, vargas-garcía MC, López MJ, Moreno J, 2007. Effect of horticultural waste composting on infected plant residues with pathogenic bacteria and fungi: integrated and localized sanitation. *Waste Management* 27:886–892.
- Suelmann R, Fischer R, 2000. Nuclear migration in fungi – different motors at work. *Research in Microbiology* 151:247–254.
- Tamietti G, Valentino D, 2006. Soil solarization as an ecological method for the control of *Fusarium* wilt of melon in Italy. *Crop Protection* 4:389–397.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E, 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75:291–295.
- Thornton CR, 2008. Tracking fungi in soil with monoclonal antibodies. *European Journal of Plant Pathology* 121:347–353.
- Tittarelli F, Rea E, Verrastro V, Pascual JA, Canali S, Ceglie FG, Trichera A, Rivera CM, 2009. Compost-based nursery substrates: effect of peat substitution on organic melon seedlings. *Compost Science and Utilization* 17:220–228.
- Trillas MI, Casanova E, Cotxarrera L, Ordovás J, Borrero C, Avilés M, 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biological Control* 39:32–38.
- Validov SZ, Kamilova FD, Lugtenberg BJJ, 2011. Monitoring of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strains during tomato plant infection. *Microbial Biotechnology* 4:82–88.

- Verma M, Brar S, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR, 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.; Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37:1–20.
- Viterbo A, Ramot O, Chernin L, Chet I, 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:549–556.
- Waller P, Thornton CR, Farley D, Groenhof AC, 2008. Pathogens and other fungi in growing media constituents. *Acta Horticulturae* 779:361–365.
- Weaver RW, Angle S, Bottomley P, Bezdicek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A, 1994. *Methods of Soil Analysis. Part II. Microbiological and Biochemical Properties.* Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 329–350.
- Welsh J, McClelland M, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18:7213–7218.
- Whipps JM, Lumsden RD, 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. En: Butt T, Jackson C, Magan N (eds.), *Fungal Biocontrol Agents: progress, Problems and Potential*, CABI Publishing, Wallingford, pp. 9–22.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic Press Inc., San Diego, CA, pp. 315–322.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak K, Rafalski JA, Tingey SV, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18:6531–6535.
- Xu, J., Zhao, X., Han, X., Du, Y., 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87:220–228.
- Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I, 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology* 69:7343–7353.
- Yin Y, Ding L, Liu X, Yang J, Ma Z, 2009. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in Planta by a Real-time PCR Assay. *Journal of Phytopathology* 157:465–469.

Bibliografia

- Yogev A, Raviv M, Hadar Y, Cohen R, Katan J, 2006. Plant waste-based composts suppressive to diseases caused by pathogenic *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Plant Pathology* 116:267–278.
- Zambounis AG, Paplomatas E, Tsaftaris AS, 2007. Intergenic Spacer–RFLP Analysis and Direct Quantification of Australian *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Isolates from Soil and Infected Cotton Tissues. *Plant Disease* 91:1564–1573.
- Zhang T, Fang HHP, 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:281–289.
- Zhang L, Liu X, Zhu S, Chen S, 2006. Detection of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* in soil by real-time PCR and parasitism bioassay. *Biological Control* 36:316–323.
- Zhang Z, Zhang J, Wang Y, Zheng X, 2005. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. *FEMS Microbiology Letters* 249:39–47.
- Zhou L, Bailey KL, Derby J, 2004. Plant colonization and environmental fate of the biocontrol fungus *Phoma macrostoma*. *Biological Control* 30:634–644.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante