



*EFFECTE DE LA MELASSA SOLA I
COMBINADA AMB TRICHODERMA
SOBRE LA DENSITAT FÚNGICA I
BACTERIANA DEL SÒL*

Treball final de grau

Enginyeria de Sistemes Biològics



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH**

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

Autora: Sandra Herranz Codina

Tutors: Francesc Xavier Sorribas

Núria Escudero

Setembre 2018

Resum

Els nematodes fitopatògens endoparàsits sedentaris del gènere *Meloidogyne* spp són els principals causants de patologies en l'agricultura. Actualment, per eradicar aquests patògens s'utilitzen agents químics, principalment nematicides, els quals afecten al medi ambient i la salut humana. Durant els últims anys s'ha potenciat la recerca d'alternatives no tant agressives però igual d'efectives. En aquest projecte es presenta com a possible alternativa l'aplicació de la combinació de la melassa i el fong *Trichoderma asperellum* (T34) en tomaqueres.

Per tal d'assolir l'objectiu presentat es van dur a terme experiments de semicamp i camp. En condicions de semicamp, es va determinar la dosi òptima de melassa a partir de l'aplicació setmanal de les dosis 0, 5, 10, 20 o 40 mL m⁻² de melassa sola o combinada amb T34. La inoculació de T34 va ser a raó de 0,5 g m⁻² durant 24 hores abans de la trasplantació de la tomaquera, i just després, les plantes es van regar amb una suspensió d'espores de 0,01 g L⁻¹. Un dia després del transplantament, les plantes es van a inocular amb *Meloidogyne* spp amb 1 J2 per cm³. Quan el nematode va complir una generació, es va avaluar el desenvolupament de la planta, l'activitat i densitat microbiana del sòl (FDA), la quantificació fúngica i bacteriana (qPCR), la severitat de la infecció (índex de agalles) i la multiplicació de nematodes (número de ous per planta) per cada un dels tractaments. Posteriorment, es van realitzar assajos en dos camps (Castellbisbal i Martorell) infestats per *Meloidogyne* spp. La pauta de reg amb melassa va ser determinada en els experiments de semicamp i es van determinar els mateixos paràmetres que en semicamp. En condicions de semicamp, la reducció dels nematodes es va veure sobretot en l'aplicació de melassa en dosis de 5 i 10 mL m⁻² combinada amb T34, ja que es va observar una disminució l'índex agalles i ous/planta, i un augment de FDA i de la densitat fúngica. A 40 mL m⁻² de melassa, les plantes van presentar forta fitotoxicitat. Es va seleccionar la dosi de 10 mL m⁻² per aplicar a camp. A Castellbisbal, en l'aplicació de melassa es va determinar una reducció dels nematodes i en el tractament de melassa combinat amb T34 la reducció del nematode no va ser tan severa com en semicamp. En canvi, a Martorell, no es va observar reducció del nematode ja que al tenir unes característiques diferents de sòl, podrien afectar a la distribució dels productes, així com la presència de micòfags que podrien interferir en la proliferació dels microorganismes introduïts.

PARAULES CLAU: *Meloidogyne*, melassa, *Trichoderma asperellum*, densitat fúngica i bacteriana, FDA i qPCR.

Resumen

Los nematodos fitopatógenos endoparásitos sedentarios del genero *Meloidogyne spp* son los principales causantes de patologías en la agricultura. Actualmente, para erradicar estos patógenos se utilizan agentes químicos, principalmente nematicidas, los cuales son nocivos por el medio ambiente y la salud humana. Durante los últimos años se ha potenciado la búsqueda de alternativas no tan agresivas, pero igual de efectivas. En este proyecto se presenta como una posible alternativa la aplicación de la combinación de la melaza y el hongo *Trichoderma asperillum* (T34) en tomateras.

Para alcanzar el objetivo presentado se llevaron a cabo experimentos de semicampo y de campo. En condiciones de semicampo, se determinó la dosis optima de melaza a partir de la aplicación semanal de las dosis 0, 5, 10, 20 o 40 mL m⁻² de melaza sola o combinada con T34. La inoculación de T34 fue de 0,5 g m⁻² durante 24 horas antes de la trasplantación de la tomatera, luego, las plantas se regaron con una suspensión de esporas de 0,01 g L⁻¹. Un día después de la trasplantación, las plantas se inocularon con *Meloidogyne spp* con 1 J2 por cm³. Cuando el nematodo cumplió una generación se avaluó el desarrollo de la planta, la actividad y densidad microbiana de la tierra (FDA), la cuantificación fúngica y bacteriana (qPCR), la severidad de la infección (índices de agallas) y la multiplicación de los nematodos (número de huevos por planta) para cada uno de los tratamientos. Posteriormente, se realizaron ensayos en dos campos (Castellbisbal y Martorell) infestados por *Meloidogyne spp*. La pauta de riego con melaza fue determinada en los experimentos de semicampo y se determinaron los mismos parámetros que en semicampo. En condiciones de semicampo, la reducción de los nematodos se observó principalmente en la aplicación de melaza en las dosis de 5 y 10 mL m⁻² combinada con T34, ya que se observó una disminución del índice de agallas y huevos/plantas, y un incremento de FDA y de la densidad fúngica. A 40 mL m⁻² de melaza, las plantas presentaron alta fitotoxicidad. Se seleccionó la dosis de 10 mL m⁻² para ser aplicada en el campo. En Castellbisbal, en la aplicación de melaza se determinó una reducción del número de nematodos y en el tratamiento de melaza combinada con T34 se determinó que la reducción del nematodo no fue tan grande como en semicampo. En cambio, en Martorell, no se observó reducción del nematodo ya que, al tener unas características distintas de tierra, podrían afectar a la distribución de los productos, así como la presencia de micofagos que podrían intervenir en la proliferación de los microorganismos introducidos.

PALABRAS CLAVE: *Meloidogyne*, melaza, *Trichoderma asperillum*, densidad fúngica y bacteriana, FDA y qPCR

Abstract

The sedative endoparasitic phytopathogenic nematodes of the genus *Meloidogyne* spp are the main causes of pathologies in agriculture. Currently, to eradicate these pathogens chemical agents are used, mainly nematicides, which affect the environment and human health. During the last years, the searching of alternatives not so aggressive but equally effective has been enhanced. In this project, the application of the combination of molasses and fungus *Trichoderma asperellum* (T34) in tomatoes is presented as a possible alternative.

To achieve this goal, semifield and field experiments were performed. In semifield conditions, the optimum dose of molasses was determined from the weekly application of unique molasses doses (0, 5, 10, 20 o 40 mL m⁻²) or combined with T34. The inoculation of T34 was at a rate of 0,5 g m⁻² for 24 hours before the tomato transplantation, and just afterwards, the plants were watered with a spore suspension at 0,01 g L⁻¹. One day after the transplantation, the plants were inoculated with *Meloidogyne* spp with 1 J2 per cm³. When the nematode fulfilled one generation, activity and microbial density of the ground (FDA), fungi and bacteria quantification (qPCR), infection severity (index of galls) and multiplication of nematodes (eggs per plant) were analysed for each of the treatments. Next, trials were conducted in two fields (Castellbisbal and Martorell) infested by *Meloidogyne* spp. The molasses irrigation pattern was determined in the semifields experiments and the same parameters as semifield experiment were determined. In semifield condition, the reduction of the nematodes was mainly observed in the application of molasses in the doses 5 and 10 mL m⁻² combined with T34, since a decrease in the galls index and in the relation eggs/plant, and an increase in the FDA and in the fungal density were observed. At 40 mL m⁻² of molasses, plants showed strong phytotoxicity. The dose of 10 mL m⁻² was selected to be applied in the fields. In Castellbisbal, in the application of molasses, a reduction of the nematodes was determined, while in the treatment of molasses combined with T34, the reduction of the nematodes was not as severe as in the semifield condition. In contrast, in Martorell, no decrease of the nematode was observed. This could be due to the fact that having different characteristics of the soil could affect the distribution of products, as well as the presence of the mycophages in the soil by interfering with the proliferation of the microorganisms introduced.

KEY WORDS: *Meloidogyne*, molasses, *Trichoderma asperellum*, fungal and bacterial density, FDA and qPCR.

Agraïments

En primer lloc agrair el meu tutor Xavier Sorribas per brindar-me la confiança per realitzar aquest projecte i també a tots els companys del laboratori 20 per aportar coneixements i grans moments.

En especial vull agrair a la meva co-tutora Núria Escudero per la seva paciència eterna amb mi, per ensenyar-me tot lo necessari al laboratori i sobretot com a persona, ja que et transmet la seva gran passió per la feina i sobretot la seva vocació com a professora.

Agrair també el centre CRG per la seva col·laboració i proporcionar les seves instal·lacions per fer una part del meu treball.

També vull agrair a tots els meus companys que m'han acompanyat aquests anys de carrera. Sobretot a les meves amigues Marina, Andrea, Anna i Fanny. I tots els amics que ha format part del meu dia a dia a Castelldefels Tomàs, Pau, Josep, Anddy, Genís i Carles en especial a la meua companya de pis Marta. També agrair els amics del poble Magda i Jordi per l'eterna paciència amb mi.

A la meua mare i el meu pare per confiar amb mi des del principi i donar-me l'empenta necessària per començar aquesta carrera i donar-me la confiança necessària quan no creia ni amb mi mateixa. Per aguantar les meves frustracions i celebrar amb mi els triomfs.

Sumari

Índex de figures.....	7
Índex de taules.....	8
1. Introducció.....	10
1.1 Característiques del nematode <i>Meloidogyne</i>	10
1.1.1 Morfologia.....	10
1.1.2 Cicle de vida.....	10
1.1.3 Simptomatologia.....	11
1.2 Tècniques de control del <i>Meloidogyne</i> spp.....	12
1.2.1 Evidències de l'impacte negatiu dels plaguicides.....	14
1.3 Antecedents.....	15
2. Objectius.....	17
3. Material i mètodes.....	18
3.1 Experiment de semicamp i camp.....	18
3.2 Avaluació de l'activitat microbiana.....	19
3.3 Extracció de l'ADN dels microorganismes T34 i <i>B. firmus</i>	20
3.4 Extracció d'ADN dels microorganismes del sòl.....	21
3.5 Quantificació de l'ADN.....	21
3.6 qPCR.....	22
3.7 Anàlisi estadístic.....	23
4. Resultats.....	24
4.1 Determinació de l'activitat microbiana (FDA).....	24
4.1.1 Experiment de semicamp.....	24
4.1.2 Experiment de camp.....	25
4.2 Determinació de la qualitat i quantificació l'ADN.....	26
4.3 Determinació de la densitat fúngica i bacteriana (qPCR).....	29
4.3.1 Semicamp.....	29
4.3.2 Experiment de camp.....	30
5. Discussió.....	32
6. Conclusions.....	34
7. Referències.....	35

Índex de figures

Figura 1: Esquema del cicle biològic de <i>Meloidogyne</i> spp.....	11
Figura 2: Reacció química de la formació de la fluoresceïna (Adam & Duncan, 2016)	19
Figura 3: Esquema del procés de quantificació d'ADN ("Qubit Assays - ES).....	21
Figura 4: D'esquerra a dreta: sense inocular ni tractar, inoculada i no tractada, i tractades amb 5, 10, 20 i 40 mL m ⁻² de melassa setmanalment.....	25
Figura 5: Gel d'electroforesi en 0,8% d'agarosa. Les bandes superiors que s'observen corresponen a l'ADN genòmic de: M marcador, Bf <i>Bacillus firmus</i> , T34 <i>Trichoderma asperellum</i> i Pc <i>Pochonia clamidosporia</i> (senyalitzades amb una fletxa).....	27
Figura 6: Gel d'electroforesi en 0,8% d'agarosa. Les bandes superiors que s'observen corresponen a l'ADN genòmic de les mostres del sòl de subparel·les de Martorell: Control 3 (C3), control 4 (C4), melassa 3 (M3), melassa 5 (M5) i melassa combinada amb T34 1 (TM1)..	27

Índex de taules

Taula 1: Nom, seqüència i programa per la qPCR del encebadors universals per fongs i bacteris. (Pereira e Silva et al. 2012).....	22
Taula 2: Concentracions dels reactius utilitzats en la MasteMix per la qPCR.....	23
Taula 3: Activitat microbiana estimada mitjançant la concentració de FDA ($\mu\text{g h}^*\text{g}^*\text{mL}^{-1}$) del sòl tractat a diferents dosis de melassa (0, 5, 10, 20 i 40 mL m^{-2}) sola o combinada <i>Trichoderma asperellum</i> T34, 39 dies després de trasplantar en contenidors de 3 L.	24
Taula 4: Activitat microbiana ($\mu\text{g h}^*\text{g}^*\text{mL}^{-1}$) en condicions de camp del sòl a l'inici i final de cultiu tractats setmanalment amb 10 mL m^{-2} de melassa (Melassa), combinat amb T34 (Melassa i <i>Trichoderma</i>) o no tractat (control).	25
Taula 5: Activitat microbiana ($\mu\text{g h}^*\text{g}^*\text{mL}^{-1}$) en condicions de camp del sòl a l'inici i final de cultiu tractats setmanalment amb 10 mL m^{-2} de melassa (Melassa), combinat amb T34 (Melassa i <i>Trichoderma</i>) o no tractat (control).	26
Taula 6: Quantificació de l'ADN del microorganismes.....	28
Taula 7: Resultats de la quantificació d'ADN de l'experiment de melassa a diferents dosis, (-); significa que la concentració d'ADN per aquest tractament va ser molt baix i no es poder quantificar.	28
Taula 8: Resultats del camp de Castellbisbal i Martorell de la quantificació d'ADN del sòl a l'inici i final de cultiu tractats setmanalment amb 10 mL m^{-2} de melassa (Melassa), combinat amb T34 (Melassa i <i>Trichoderma</i>) o no tractat (control). (-); significa que la concentració d'ADN per aquest tractament va ser molt baix i no es poder quantificar.....	29
Taula 9: Densitat microbiana (ng d'ADN) del sòl tractat a diferents dosis de melassa (0, 5, 10, 20 i 40 mL m^{-2}) sola o combinada <i>Trichoderma asperellum</i> (T34), 39 dies després de trasplantar en contenidors de 3 L.....	30
Taula 10: Densitat microbiana del sòl (ng d'ADN) a l'inici i al final del cultiu tractats setmanalment amb 10 mL m^{-2} de melassa (Melassa, combinar amb <i>Trichoderma asperelum</i> , T34 (melassa i <i>Trichoderma</i>) o no tractat (control).	30

Taula 11: Densitat microbiana del sòl a l'inici i al final del cultiu tractats setmanalment amb 10 mL m⁻² de melassa (Melassa, combinar amb *Trichoderma asperelum*, T34 (melassa i *Trichoderma*) o no tractat (control)..... 31

1. Introducció

L'agricultura és un pilar fonamental de l'economia i la dieta humana, però aquesta es veu greument afectada per patògens, destacant els danys causats per els nematodes fitopatògens. La presència de patògens provoca grans pèrdues econòmiques, concretament, segons la FAO, els fitopatògens, són responsables aproximadament del 25% de les pèrdues totals en l'agricultura mundial. (Agrios 2011).

En aquest projecte ens centrarem principalment en un tipus de fitopatògens: els nematodes. Els nematodes són organismes que pertanyen al regne animal i són part del grup de Pseudocelomats, fílum Nematoda. Són animals microscòpics amb un aspecte vermiforme que generalment viuen en ecosistemes aquàtics, però també poden viure en el sòl. Els nematodes capaços de proliferar en el sòl s'alimenten principalment de les plantes a les quals els hi produeixen una gran varietat de malalties (Agrios 2011). De totes les malalties causades pels nematodes, en aquest projecte ens centrarem en les causades pel gènere *Meloidogyne* els quals són fitopatògens endoparàsits sedentaris que s'alimenten de les arrels (Agrios, 2011).

Meloidogyne és un dels principals gèneres de nematodes, anomenats com a nematodes fitoparàsits formadors d'agalles (Chan et al. 2015). Es troben per tot el món, però amb major freqüència en regions de clima càlid i hiverns curts i moderats. També es poden trobar en hivernacles on no s'utilitzen sòls esterilitzats. A més, poden arribar a infectar a més de 2000 plantes (Agrios 2011).

1.1 Característiques del nematode *Meloidogyne*

1.1.1 Morfologia

Aquest gènere de nematodes tenen una forma allargada i no tenen extremitats o altres apèndixs. Les femelles de l'espècie poden inflar-se a la maduresa i adquireixen una forma de pera (Agrios 2011).

1.1.2 Cicle de vida

El creixement del nematode es dur a terme en dues fases: primerament en el sòl i posteriorment a l'interior de l'arrel de la planta hoste. El desenvolupament es veu influenciat per factors

ambientals, essent la temperatura del sòl el factor més important, ja que són animals poiquiloterms, per tant el cicle de vida pot durar més o menys temps depenent de la temperatura. Aproximadament el cicle de vida és de 25 dies a temperatures de 27 °C (Agrios 2011). El cicle de vida dels nematodes consta de diferents etapes: una etapa embrionària, quatre etapes juvenils (J1-J4) i una etapa adulta. El cicle de vida del nematode (Figura 1) comença dins del mateix ou, on es realitzarà la primera muda donant lloc a la primera etapa juvenil J1. Posteriorment adquireix una forma vermiforme assolint l'etapa J2, la qual és l'única etapa amb capacitat infectiva (Agrios 2011), on s'estableixen en el cilindre vascular de la planta, formant les anomenades "giant cels" (cèl·lules gegants), les quals provoquen deformacions anomenades nòduls o agalles. Un cop finalitzada la infecció, els nematodes es tornen sedentaris i muden donant lloc a les etapes J3 i J4. Per últim, té lloc l'última muda en la qual es diferencien entre mascles o femelles segons les condicions ambientals.

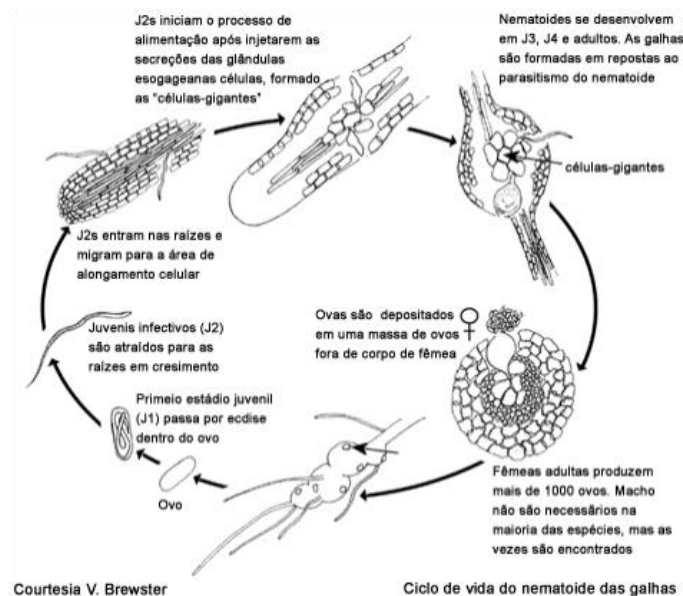


Figura 1: Esquema del cicle biològic de *Meloidogyne spp* (Agrios,2011)

1.1.3 Simptomatologia

Els nematodes (*Meloidogyne spp.*) danyen a la planta debilitant la punta de les arrels de manera que es disminuirà la capacitat d'absorbir nutrients i aigua del sòl. Al mateix temps, els nematodes inhibeixen el desenvolupament de la planta provocant l'aparició de nòduls o agalles en les arrels, el qual és la simptomatologia més distintiva de la infecció per nematodes (Agrios 2011). L'abundància d'aquests nòduls en les plantes proporciona informació sobre la gravetat de la malaltia i correlaciona amb la seva capacitat per absorbir aigua i nutrients. La part aèria

també es veu afectada per la infecció de nematodes donant lloc a un creixement deficient i a una menor quantitat de fulles les qual adquireixen un color groguenc (Mahdy 2002).

1.2 Tècniques de control del *Meloidogyne* spp

Per prevenir i reduir els nematodes, les tècniques més utilitzades són una combinació dels mètodes de controls físics, químics, biològics i culturals. El tractament més exitós és una combinació de tractament biològic i químic (Mahdy 2002).

Els mètodes de control biològic consisteixen en la utilització d'organismes vius per tal d'induir gens de la planta que augmentin la resistència a patògens o en alliberar microorganismes antagonistes o virulents contra el patogen. Els més utilitzats són els sòls supressius i la resistència vegetal induïda. L'objectiu del control biològic és el de reduir el dany produït per una plaga i la reducció de la severitat de la infecció (Flor Peregrín 2013). Concretament, en aquest projecte, el patogen a combatre són els nematodes. S'ha descrit que els fongs són el millor antagonista envers els nematodes ja que aconseguen la millor parasitació dels nematodes fitopatògens (Sorribas et al., 2007). Per tant en el projecte s'inclourà el fong *Trichoderma asperellum* per observar com afecte en la reducció del *Meloidogyne* i en l'activitat i densitat fúngica i bacteriana.

El mètodes químics consisteixen en l'aplicació de compostos químics per tal d'elaborar plaguicides els quals s'utilitzen per protegir les plantes de la possible infecció o bé per eradicar patògens que ja han infectat a la planta (Agrios 2011). Dins dels plaguicides cal destacar-ne els nematicides. Els nematicides són el mètode de control químic més utilitzat en front a *Meloidogyne* spp, ja que tenen una eficàcia immediata i a la seva gran facilitat d'aplicació. Tot i això, degut al seu ús descontrolat, han comportat a una destrucció dels ecosistemes. A més a més, tenen un alt nivell de toxicitat per a la salut humana (Aktar et al. 2009). Per tant l'objectiu és trobar alternatives als mètodes químics sostenibles amb el medi ambient i la salut humana.

Com a alternativa als mètodes químics s'estan desenvolupant i investigant tècniques amb un menor impacte pel medi ambient com són les tècniques de resistència vegetal i l'ús melassa (un tipus d'esmena orgànica):

- Sòls supressius: varis patògens que habiten en el sòl es desenvolupen bé i causen malalties severes (sòls propicis), però en altres sòls es desenrotllen menys i també poden provocar malalties més moderades. Els mecanismes pels quals el sòl inhibeix el desenvolupament dels patògens no sempre és clar i també depèn de cada patogen. Pot

ser per les poblacions antagonistes (fongs o bactèries), per la creació antibiòtics o pel sol fet de competir per l'aliment. I també sorgeix el sòl supressiu per la pràctica de la rotació de cultius, ja que dóna temps suficient als microorganismes antagonistes residents del sòl a que destrueixin al patògen (Agrios 2011).

- Resistència vegetal induïda: L'ús de varietats de plantes resistents és el mètode més econòmic, assequible, segur i amb la major taxa d'efectivitat que hi ha en l'actualitat (Agrios 2011). Les varietats de plantes resistents s'ha vist que presenten el gen Mi.1 el qual dóna resistència envers a *M.arenaria*, *M.incognita* i *M. Javanica* (Sorribas et al. 2005). Tot i així, hi ha poblacions de nematodes que són capaces de reproduir-se en plantes resistents. Aquest fet podria ser degut a l'efecte de les altes temperatures les quals inhibeixen l'expressió del gen Mi.1, o degut a l'existència de poblacions virulentes resistents a la presència del gen Mi.1 (Sorribas et al., 2005). Aquesta resistència de les poblacions virulentes pot ser adquirida de forma natural o per una exposició repetida de la població de nematodes a plantes portadores del gen Mi.1 (Verdejo-Lucas, 2013). Per tal d'evitar l'aparició de poblacions virulentes resistents a aquest gen, s'ha vist que inoculant altres microorganismes (control biològic) en les plantes resistents (Agrios, 2011), aquestes són capaces d'activar una sèrie de vies metabòliques les quals incrementen l'expressió d'altres gens ja presents en la planta amb capacitat de resistència enfront a patògens (Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (Cuba) 1986; Martínez-Medina et al. 2017).
- Esmenes orgàniques i biofumigació: la utilització d'esmenes orgàniques com a compost actua com a nematicida, degut a la seva descomposició en compostos rics en nitrogen alliberant tòxics volàtils (com NH_4^+ i H_2SO_4) (Lazarovits et al., 2008). L'acció d'aquestes substàncies redueix la densitat de nematodes fitopatògens i estimula l'activitat d'antagonistes ja presents en el sòl. També milloren la fertilitat del sòl que és el seu ús tradicional.

En particular, dins de les esmenes orgàniques trobem la melassa, que és un subproducte de la indústria sucrera que s'utilitza com a fertilitzant (Boletinagrario, 2011). La supressió i la reducció de l'activitat dels nematodes deguda a l'acció de la melassa pot ser gràcies al potencial osmòtic de la solució o a la capacitat d'augmentar l'activitat microbiana antagonista que utilitza el mateix substrat.

1.2.1 Evidències de l'impacte negatiu dels plaguicides

L'agricultura és la principal font de producció d'aliments. Tal com s'ha esmentat anteriorment, l'agricultura es troba amenaçada per diferents patògens. Per tal de disminuir les pèrdues causades pels patògens s'utilitzen diferents recursos, sent els plaguicides els més utilitzats i els més efectius. Tot i així, els plaguicides comporten un risc tant a nivell sanitari com a nivell ambiental. Malgrat això, segons estudis realitzats per la FAO, la reducció o l'eliminació de l'aplicació de plaguicides comportaria un increment del preu dels productes agrícoles en un 50-70% i al mateix temps es reduiria la producció agrícola un 30-40% (García i Navarro, 1996).

Els organofosforats són plaguicides que actuen sobre el sistema nerviós dels organismes. Actualment encara es troben en ús i presenten una elevada toxicitat pel ésser humà, fins i tot durant la Segona Guerra Mundial van ser utilitzats com a gas tòxic (Plaguicides aliments. pdf). Actualment, aquest plaguicides s'estan intentant substituir per compostos biodegradables (García i Navarro, 1996).

El nematicida comentat és el que han tingut una repercussió mediàtica més gran, tot i així, actualment hi ha 9 tipus nematicides reglamentats en la Unió Europea. (EU Pesticides data base – European Commission), al qual són els següents: *Bacillus firmus* I-1582, Dazomet, Etoprofos, Fenamifòs, Fostiazat, Metam (inclòs sodi i potassi), Oxamil, *Paecilomyces lilacinus* soca 251 i *Pasteuria nishizawae* Pn1.

Durant els últims anys, els problemes sanitaris i ambientals causats pels plaguicides ha donat lloc a la implementació de lleis que regulen i prohibeixen el seu ús, com per exemple la directiva europea 91/414/CEE 27.

La problemàtica nociva i les lleis en contra dels plaguicides causarà, en un futur no molt llunyà, que els mètodes químics no siguin tècniques viables per a la resolució dels problemes causats per les plagues d'espècies virulentes en l'agricultura. Per això, cada cop més, s'està intensificant la investigació de mètodes alternatius. En aquest cas, en el nostre projecte, ens centrarem en la explotació dels controls biològics (fong T34) i culturals (melassa) com a alternatives potencials als mètodes químics, concretament als nematicides.

1.3 Antecedents

En aquest projecte utilitzarem com a control biològic el *Trichoderma T34* i com a control cultural la melassa, ja que en la bibliografia es poden trobar evidències que indiquen que la seva combinació podria donar lloc a una alternativa potencial als mètodes químics.

Haichao Guo (2017) va observar que la combinació de les esmenes orgàniques gallinassa i melassa, (22 mg ha⁻¹ i 13,9 m³ ha⁻¹, respectivament) en tomaqueres sobre els nematodes fitoparàsits, donava com a resultat, en comparació als efectes de l'agent químic Pic-Clor 60, una disminució de la població de nematodes i al mateix temps millorava el rendiment de la planta en la formació de fruits sense afectar la qualitat d'aquests (Guo et al., 2017).

Vawdrey & Stirling (1997) van demostrar que una aplicació de 10 g de melassa per litre d'aigua en tomaqueres reduïa la formació de nòduls en les arrels i la reproducció dels nematodes (Vawdrey and Stirling, 1997).

La investigació de Baños (2010) es va basar en la relació entre els dos agents descrits anteriorment: la melassa i el *Trichoderma*. Es van aplicar dos tipus d'esmenes orgàniques (gallinassa i melassa) conjuntament amb l'addició de *Trichoderma* (*T. viride* i *T. Harzianum*) en tomàquet. L'estudi va concloure que l'aplicació inicial de 9 kg ha⁻¹ de *Trichoderma* i la seva posterior reducció a 3 kg ha⁻¹ de dosi setmanal durant 45 dies, reduïa el grau d'infecció de *Meloidogyne spp* a un grau d'agalles del 2,0 i 1,94 (escala de 0-5) enfront als 3,7 graus d'agalles del control. L'aplicació de *T. viride*, *T. harzianum* i melassa va manifestar un increment de les variables morfològiques, fisiològiques i productives del cultiu, donant uns rendiments del 47,05, 46,56 i 38,75 t ha⁻¹ respectivament, sobre el rendiment del control (26,81 t ha⁻¹).

Medeiros (2017) va demostrar amb un disseny d'arrel partida, que *T. atroviride* indueix resistència sistèmica a *M. javanica*, sense la necessitat que els organismes estiguessin sense contacte directe, i redueix el nombre d'agalles un 20 % i la presència de nematodes un 87%. La primera generació de tomàquets va ser encebada amb *T. atroviride* heretava resistència contra els nematodes agalladors i les tomaqueres van mostrar més grandària i resistència *M. javanica* sense afectar el seu creixement (Medeiros et al. 2017).

A més a més, recentment s'ha demostrat *T. Harzianum* és capaç d'induir mecanismes de resistència enfront a *M. incognita* (Martínez-Medina et al. 2017).

Aquests precedents demostren el possible potencial de la melassa i el fong *Trichoderma asperellum* com a possibles controls de *Meloidogyne spp*. En aquest projecte s'emmarca l'estudi

de l'efecte de la melassa en diferents dosis d'aplicació i l'addició de *Trichoderma*, així com també l'estimació de l'efecte de la melassa i el fong sobre l'activitat i la densitat microbiana del sòl sobre cultius del Baix Llobregat.

Aquest projecte de final de grau s'emmarca dintre del projecte "Efecte combinat de la dosis de melassa i de microorganismes inductors de la resistència vegetal sobre el nematode *Meloidogyne spp*, i la microbiota del sòl i la productivitat vegetal". (Ref. 5305012017), concedit pel Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya.

2. Objectius

L'objectiu principal del projecte va ser determinar l'estimació de l'efecte de la melassa i la seva combinació amb el fong *Trichoderma* sobre l'activitat microbiana i la densitat bacteriana i fúngica del sòl, aplicant melassa en diferents dosis i la seva combinació amb el fong *Trichoderma* contra el nematode *Meloidogyne* en experiments de semicamp i camp.

3. Material i mètodes

3.1 Experiment de semicamp i camp

L'experiment de semicamp per avaluar la combinació de la melassa i el fong *Trichoderma asperellum* (T34), es va dur a terme en l'hivernacle de Agropolis localitzat a Viladecans. La melassa va ser proporcionada per la cooperativa Agraria del Vallés en les Franqueses i el T34 va ser subministrada per la professora Isabel Trillas de la Universitat de Barcelona. Es va realitzar en torretes de 3 L que es van omplir de substrat. El substrat provenia de la parcel·la de Castellbisbal, que ja havia tingut un historial de problemes causants per *Meloidogyne* spp. Es va prendre 40 submostres de sòl de la parcel·la, distribuïdes en zig-zag i en els primers 30 cm de la superfície del sòl. Finalment es va barrejar amb sorra estèril en proporció 1:1 (v:v) per evitar la compactació i afavorir el desenvolupament de les arrels.

Cada una de les torretes es va inocular a raó de 1 J2 per cada cm³ de substrat i posteriorment es va plantar les tomaqueres amb tres fulles verdaderes. L'assaig va consistir en diferents tractament: plantes irrigades amb melassa en diferents dosis aplicació (0, 5, 10, 20 i 40 mL m⁻²) sola i les mateixes dosis de melassa amb *Trichoderma asperellum* (T34). A més a més, el tractament de plantes control va consistir en tomaqueres sense inocular amb *Meloidogyne* i tampoc van rebre cap tractament amb melassa ni T34.

La inoculació amb melassa es va realitzar mitjançant dos forats de 3 cm de profunditat just després de transplantament i posteriorment setmanalment fins a finalitzar l'assaig. L'aplicació de T34 es va realitzar 24 hores abans de trasplantar la tomaquera a raó de 0,5 g m⁻², i un altre just després de transplantament regant el sòl amb una suspensió d'espores de 0,01 g L⁻¹. Cada tractament va comptar amb un total de 10 repeticions. Les plantes van ser regades segons les necessitats de cultiu i aquelles que no tenen melassa es van regar amb el mateix volum d'aigua.

Les plantes es van mantenir fins que *Meloidogyne* va completar una generació. En aquest moment es van tallar la part aèria de cada una de les plantes i es van mantenir durant 48 h en una estufa a 65°C per determinar el pes sec de les plantes. Es va avaluar el pes fresc radicular i en número de nematodes totals a partir de l'índex d'agalles descrit per Zeck (1917) i la relació ous/plantes (Taula A, B i C, annex 1). L'índex d'agalles és una tècnica que es basa en assignar valors numèrics del 0 (planta amb arrels sanes) al 10 (planta amb arrels mortes) segons la severitat de la malaltia, mentre que la relació ous/planta es basa en la comptabilització dels ous en el microscopi utilitzant una càmera de Hawksley. Per avaluar l'activitat i densitat microbiana es va ajuntar el substrat de 3 torretes i d'aquesta manera es va obtenir un total de 3 repeticions

per tractament. El sòl es va guardar a 4 °C fins al seu posterior ús per la anàlisi de FDA i a -20°C per a la determinació de densitat microbiològica per qPCR (Adam and Duncan; Green et al., 2006).

Els experiments de camp es va dur a terme en dos camps diferent a Martorell i Castellbisbal. El camp es va dividir en 3 parcel·les, una per cada tractament (Control, melassa i melassa amb T34) i cada parcel·la es va dividir en 5 subparcel·les de 10 m² cada una, les qual es va avaluar la densitat del nematodes en el sòl. La melassa es va aplicar per injecció en el sistema de reg amb una concentració de 10 mL m⁻², ja que va ser la menor dosis de melassa al qual es va determinar una disminució en la densitat del nematode en els experiments de semicamp. Les parcel·les no tractades es va aplicar el mateix volum d'aigua. En cada una de les subparcel·les es va plantar 8 tomaqueres intercalades amb enciams.

Per avaluar l'activitat i la densitat microbiana dels sòls es va agafar 2 mostres de cada subparcel·la abans d'iniciar l'experiment i al final d'aquest. L'activitat microbiana es va mesurar en totes les parcel·les, per la determinació de la densitat de fong i bacteris es van a escollir 2 parcel·les de cada tractament amb densitats similars de nematodes inicials en el sòl. Les parcel·les seleccionades van ser per Martorell: control 3 i 4, melassa 3 i 5 i per melassa combinada amb T34 1 i 2. I per Castellbisbal: control 2 i 4, melassa 3 i 5 i per melassa combinada amb T34 2 i 4.

3.2 Avaluació de l'activitat microbiana

L'activitat microbiana es va avaluar mitjançant la tècnica d'hidròlisi del diacetat de fluoresceïna (FDA), el qual es basa en determinar l'activitat dels enzims microbians capaços de degradar el FDA com són les proteases, lipases i esterases sense afectar a les cèl·lules dels microorganismes presents el sòl . El producte de la reacció enzimàtica és la fluoresceïna (Figura 2) i es mesura utilitzant amb un espectrofluorímetre. (Green et al. 2006; Adam & Duncan, 2016)

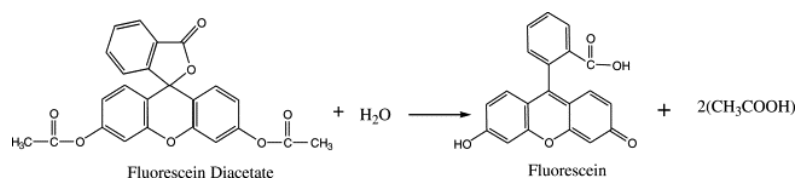


Figura 2: Reacció química de la formació de la fluoresceïna (Adam & Duncan, 2016)

Per realitzar la tècnica de FDA es va seguir el procediment descrit por(Fernández et al., 2001). Es van pesar 2 g de sòl homogeneïtzat de cada parcel·la i tractament. El sòl homogeneïtzat es va

col·locar en tubs de centrifuga de 50 ml als quals se'ls hi va afegir 10 mL de tampó fosfat (0,05 mol L⁻¹ de K₂HPO₄ i 0,01 mol L⁻¹ KH₂PO₄). La reacció enzimàtica es va iniciar afegint 1 mL de diacetat de fluoresceïna (0,002 mmol mL⁻¹) i els tubs es van incubar a 37 °C durant 45 min a la foscor. Un cop finalitzada la incubació, la reacció enzimàtica va ser aturada afegint 10 ml d'isopropanol. Es van centrifugar els tubs a 3000 rpm durant 10 min i es va mesurar la fluorescència a 490 nm d'excitació i 520 nm d'emissió, agregant 200 µL del sobrenedant a plaques microtiter i fent la seva lectura a l'espectrofluorímetre *BIO-TEK Synergy HT*. Finalment per comprovar que cap altre element apart del microorganismes presents en el sòl emetia fluorescència a la mateixa longitud d'ona que la fluoresceïna, es va utilitzar sòl esterilitzat. Per determinar els valors de fluorescència de les mostres, es van elaborar unes rectes patrons mitjançant dilucions conegudes de sal de fluoresceïna en un rang de concentracions de 0-15 µg mL⁻¹.

Per determinar l'activitat microbiana les mostres del sòl es va repetir un mínim de 9 repliques tècniques.

3.3 Extracció de l'ADN dels microorganismes T34 i *B. firmus*

Per obtenir l'ADN del microorganismes es va utilitzar el mètode CTAB (Lopez-Llorca et al., 2010). Aquest mètode requereix haver obtingut prèviament la biomassa de *Trichoderma asperellum* (T34) i *Bacillus firmus*. La obtenció de la biomassa es va realitzar a partir de cultius purs de *T. asperellum*. *T. asperellum* es va fer créixer en medi PDB (10 g L⁻¹ de peptona de patata i 20 g L⁻¹ de glucosa) (brou de destrossa de patata, Sharlau), mentre que *B. firmus* es va fer créixer en medi de LB (10 g L⁻¹ de triptona, 10 g L⁻¹ NaCl i 5 g d'extracte de llevat L⁻¹). Els dos cultius es van deixar créixer durant 5 dies.

De la biomassa obtinguda es van pesar 50-75 mg, als quals es van afegir 500 µl de CTAB buffer (TRIS 100 mM pH 8,4; NaCl 1,4 M; EDTA 25 mM pH 7,5 i CTAB 2% + PVP 2%) i *glass bead* per afavorir la disgregació del teixit, es va incubar durant 1 hora a 65 °C en agitació a 900 rpm. Posteriorment es van afegir 365 µl de fenol (SIGMA) i 365 µl de cloroform isominoalcohol (24:1 ; v:v) i es va centrifugar durant 10 min a 10000 rpm. El sobrenedant obtingut es va traspasar en un nou tub de centrifuga, es va realitzar un rentat amb cloroform isominoalcohol (24:1) i es va centrifugar durant 10 min a 10000 rpm. En el sobrenedant obtingut es van afegir 750 µl d'isopropanol fred (-20 °C) i es va deixar la solució durant 15 min a -20 °C per afavorir la precipitació de l'ADN. Posteriorment es va centrifugar a 4°C durant 10 min a 10000 rpm. Es va

descartar el sobrenedant i el pellet es va rentar 2 vegades amb 500 µl d'etanol al 70 % a -20 °C. El pellet es va deixar assecat a la campana i es va re-suspendre amb 200 µl de TNE 1X (1M de TRIS, 0,5M de EDTA 0,5M i 5M de NaCl) i 1 µl de RNAasa. Es va incubar 1 hora a 37 °C per degradar el RNA present a la mostra. Al finalitzar la incubació es van afegir 200 µl de cloroform isominoalcohol (24:1) i es va centrifugar durant 10 min a 10000 rpm. Es va recollir el sobrenedant a un nou tub de centrifuga i es va afegir 500 µl d'etanol absolut fred (-20 °C) i es va centrifugar durant 20 min a 4 °C i a 10000 rpm. Finalment es va descartar el sobrenedant, es va deixar assecat el pellet i es va re-suspendre en 100 µl d'aigua destil·lada. L'ADN es va conservar a -20°C fins la seva utilització.

La qualitat de l'ADN genòmic obtingut es va analitzar mitjançant la realització d'una electroforesi de gel d'agarosa del 0,8 % en TBE (45 mM Tris, 1,3 mM EDTA, 45 mM àcid bòric) a 0,5X. Al gel es van afegir 2 µL de *gel red* (Biotium), un agent intercalant que s'uneix a l'ADN de doble cadena, per la seva visualització en un transil·luminador.

3.4 Extracció d'ADN dels microorganismes del sòl

Per obtenir d'ADN dels microorganismes del sòl dels experiments de semicamp i camp es va utilitzar el kit *DNAeasy® PowerSoil Kit®* (QIAGEN). Per cada una de les mostres es va realitzar l'extracció d'ADN a partir de 0,2 g de sòl seguint les instruccions de la casa comercial .

Per observar la qualitat de l'ADN genòmic es va fer un gel electroforesi amb les mateixes condicions esmentades en l'apartat anterior (3.3)

3.5 Quantificació de l'ADN

La quantificació de l'ADN de les mostres del sòl es va dur a terme a les instal·lacions del Centre de Regulació Genòmica (CRG) mitjançant l'espectrofluorímetre *Qubit (ThermoFisher)*. Les mostres es van incubar amb un fluorocrom específic per l'ADN de doble cadena que emet fluorescència només quan s'uneix específicament ADN de doble cadena (figura 3).

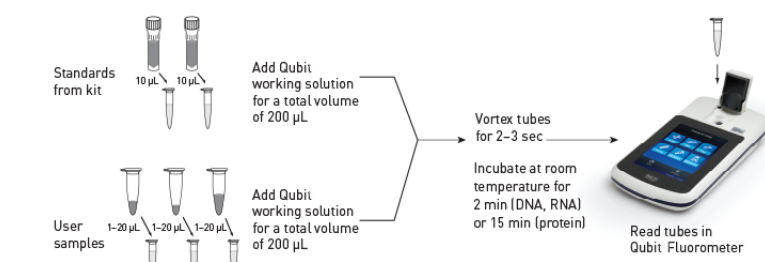


Figura 3: Esquema del procés de quantificació d'ADN ("Qubit Assays - ES)

3.6 qPCR

Per determinar la densitat microbiana de fongs i bacteris del sòl s'ha utilitzat la PCR quantitativa (qPCR) la qual és emprada per la quantificació de l'ADN. Per la detecció de les còpies obtingudes en la qPCR es va utilitzar *SYBRGreen*, que és directament proporcional a la quantitat del producte. Un cop finalitzada la qPCR es va fer una corba de dissociació per analitzar i descartar els productes inespecífics.

Per quantificar la densitat de fongs i de bacteris existents en les mostres del sòl, es va realitzar una recta de patró amb l'ADN genòmic de *B. firmus* i T34 obtinguts a l'apartat 3.3. Per realitzar la recta es van utilitzar les següents concentracions conegudes: 10, 1, 0,1, 0,01 i 0,001 ng μL^{-1} . La concentració de 0 ng μL^{-1} va ser utilitzat com a control negatiu, per poder identificar possibles contaminacions durant el procediment, ja que l'ús d'encebadors universals en la qPCR la mínima presència d'algun microorganisme d'origen extern a les mostres del sòl es veuria amplificat donant unes lectures errònies. Els encebadors utilitzats es mostren a la taula 1:

Taula 1: Nom, seqüència i programa per la qPCR del encebadors universals per fongs i bacteris. (Pereira e Silva et al. 2012).

Microorganismes	Nomenclatura encebadors	Seqüència (5'-----3')	Cicles
Bacteri	16SFP	GGTAGTCYAYGCMSTAAACG	95°C 10 min, 1 cicle 95°C durant 27 s, 62°C durant 1 min, 72 °C durant 30 s, 39 cicles
	16SRP	GACARCCATGCASCACCTG	
Fong	5,8S	CGCTGGCGTTCTTCATCG	95°C 10 min, 1 cicle 95°C durant 1 min, 53 °C durant 30 s, 72 °C durant 1 min, 40 cicles
	ITS1f	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	

Per a quantificar la quantitat de fongs i de bacteris presents en els diferents sòls es va a fer una qPCR amb les concentracions descrites a la Taula 2. Un cop carregada la placa de p96, es va introduir a un termociclador (*Stratagene Mx3005P*, Agilent Technologies) i es va utilitzar el programa descrit en la tabla 1.

Taula 2: Concentracions dels reactius utilitzats en la MasteMix per la qPCR

Concentracions dels reactius de la MasterMix (unitat)	
Syber Green	12,5 µL
Encebador Forward	0,3 µM
Encebador reverse	0,3 µM
ADN	2 ng µL ⁻¹

Finalitzada la qPCR es van determinar els valors de C_T corresponents al cicle umbral de PCR de cada mostra analitzada els quals indiquen canvis significatius en la quantitat d'ADN de doble cadena per cada una de les mostres. Un cop obtinguts els valors de C_T , es va procedir a la anàlisi dels resultats amb l'elaboració de la recta de calibratge a partir dels valors obtinguts de les C_T i les concentracions de les dilucions estàndards de *Bacillus firmus* i *Trichoderma asperellum*. A partir d'aquestes rectes es va calcular la concentració de la densitat fúngica i bacteriana de les mostres del sòl extrapolant el valor de C_T d'aquestes mostres mitjançant les rectes patró.

Per últim es va comprovar que no hi hagués contaminacions i que els amplicons es trobessin dintre de la mida esperada dels productes de la PCR. Per fer aquestes verificacions es va realitzar una electroforesis amb gel d'agarosa al 2 %, seguint el procediment esmentat a l'apartat 3.3.

Per determinar la densitat fúngica i bacteriana les mostres del sòl es va repetir un mínim de 3 repliques tècniques.

3.7 Anàlisi estadístic

Les dades es van sotmetre a anàlisi no paramètric segons el test de *Wilcoxon* mitjançant el procediment *proc npar1way* del programa estadístic SAS v 9.2. L'activitat microbiana (FDA) i la densitat de microorganismes es va contrastar a l'inici i al final de l'assaig per a saber si canviava amb el temps. Així mateix, es van contrastar les del sòl no inoculat i inoculat amb el nematode per a saber si aquest afectava l'activitat i densitat microbiana. Finalment, l'efecte dels tractaments sobre l'activitat i abundància microbiana considerant les variables dosi de melassa i aplicació de *Trichoderma*.

4. Resultats

4.1 Determinació de l'activitat microbiana (FDA)

4.1.1 Experiment de semicamp

L'activitat microbiana del sòl de l'experiment de semicamp es va determinar mitjançant la tècnica de FDA. Les activitats microbianes estimades respecte a les diferents dosis aplicades de melassa i amb la seva combinació amb el fong T34 (melassa-T34), es mostren en la Taula 3. Es va observar com les diferents dosis de melassa aplicada (5, 10, 20 i 40 mL m⁻²) mostraven un augment significatiu de l'activitat microbiana respecte la dosi de 0 mL m⁻². D'altra banda, si s'analitzen les activitats microbianes que van ser obtingudes en la condició de melassa-T34, es va observar com les diferents dosis de melassa (5, 10, 20 i 40 mL m⁻²) en presència de T34 també presentaven un augment significatiu de l'activitat microbiana en comparació a la dosi de melassa 0 mL m⁻². Aquests resultats indicaven que la combinació de melassa i T34 també tenien un efecte sobre l'activitat microbiana

Taula 3: Activitat microbiana estimada mitjançant la concentració de FDA ($\mu\text{g (h}^*\text{g}^*\text{mL}^{-1})$) del sòl tractat a diferents dosis de melassa (0, 5, 10, 20 i 40 mL m⁻²) sola o combinada *Trichoderma asperellum* T34, 39 dies després de trasplantar en contenidors de 3 L.

Dosis de melassa (mL m ⁻²)	Inoculació amb <i>Trichoderma asperellum</i>	
	NO	SI
0	6,02 ± 0,21d*	5,69 ± 0,1d
5	8,74 ± 0,19b*	7,42 ± 0,2b
10	7,45 ± 0,14c	9,76 ± 0,18a*
20	7,47 ± 0,17c*	6,91 ± 0,14c
40	13,03 ± 0,19a*	10,17 ± 0,21a

Nota: Cada dada és mitjana ± error estàndard de 10 repeticions. Dades en la mateixa fila seguides de *, i dades en la mateixa columna seguides de diferent lletra indiquen diferències significatives segons el test no paramètric de Wilcoxon (P < 0,05).

Per tal de determinar quina de les dosis utilitzades era l'òptima per ser utilitzada en els experiments de camp, es va fer servir l'índex d'agalles i la relació ous/plantes (Taula A, annex 1). A partir de les dades de la Taula A (annex 1), es va determinar que la dosi de melassa adequada es trobava entre les dosis de 10, 20 i 40 mL m⁻² ja que mostraven els valors més baixos respecte les altres dosis estudiades. A més a més, les tomaqueres a les dosis de 20 i 40 mL m⁻², presentaven un aspecte poc saludable i una disminució del seu creixement (Figura 4) segurament degut a que a concentracions elevades de melassa provocava la formació d'un medi

anaeròbic. Per tant, es va determinar que la dosi òptima per ser utilitzada en els experiments de camp era la de 10 mL m⁻².



Figura 4: D'esquerra a dreta: sense inocular ni tractar, inoculada i no tractada, i tractades amb 5, 10, 20 i 40 mL m⁻² de melassa setmanalment

4.1.2 Experiment de camp

4.1.2.1 Castellbisbal

Un cop determinada l'aplicació de dosi òptima de melassa (10 mL m⁻²) es va mesurar l'activitat microbiana (Taula 4) del camp de Castellbisbal a l'inici i al final de l'experiment, dels següents tractaments: control, melassa i melassa combinada amb T34. Els cultius plantats van a ser tomaquera i enciam.

Taula 4: Activitat microbiana ($\mu\text{g (h}^*\text{g}^*\text{mL)}^{-1}$) en condicions de camp del sòl a l'inici i final de cultiu tractats setmanalment amb 10 mL m⁻² de melassa (Melassa), combinat amb T34 (Melassa i *Trichoderma*) o no tractat (control).

	Tractament		
	Control	Melassa	Melassa i <i>Trichoderma asperellum</i>
Inicial ($\mu\text{g (h}^*\text{g}^*\text{mL)}^{-1}$)	4,39 ± 0,11b*	5,91 ± 0,21a	6,06 ± 0,09a
Final ($\mu\text{g (h}^*\text{g}^*\text{mL)}^{-1}$)	5,81 ± 0,18a	5,72 ± 0,3a	5,83 ± 0,12a

Nota: Cada dada és mitjana ± error estàndard de 5 repeticions. Dades en la mateixa columna i paràmetre seguides de *, i de la mateixa fila seguides de diferents lletres indiquen diferències significatives segons el test no paramètric de Wilcoxon (P < 0,05).

A l'inici del experiment es va observar una disminució significativa en melassa i melassa-T34 respecte al control de l'activitat microbiana. En canvi, al final del l'experiment no es van observar diferències significatives entre els diferents tractaments aplicats. Però en el control es va observar una disminució significativa de l'activitat microbiana entre l'inici i el final de l'experiment, segurament degut a factors externs.

4.1.2.2 Martorell

Els resultats de l'activitat microbiana de l'experiment del camp de Martorell s'observen a la taula 5.

Taula 5: Activitat microbiana ($\mu\text{g (h}^*\text{g}^*\text{mL)}^{-1}$) en condicions de camp del sòl a l'inici i final de cultiu tractats setmanalment amb 10 mL m⁻² de melassa (Melassa), combinat amb T34 (Melassa i *Trichoderma*) o no tractat (control).

	Tractament		
	Control	Melassa	Melassa i <i>Trichoderma</i>
Inicial ($\mu\text{g (h}^*\text{g}^*\text{mL)}^{-1}$)	4,92 ± 0,11a*	4,92 ± 0,19a	5,26 ± 0,21a*
Final ($\mu\text{g (h}^*\text{g}^*\text{mL)}^{-1}$)	4,11 ± 0,12c	5,46 ± 0,31b	6,21 ± 0,09a

Nota: Cada dada és mitjana ± error estàndard de 4 repeticions. Dades en la mateixa columna i paràmetre seguides de *, i de la mateixa fila seguides de diferents lletres indiquen diferències significatives segons el test no paramètric de Wilcoxon (P < 0,05).

En l'activitat microbiana no es van observar diferències significatives en l'inici de l'experiment en cap dels 3 tractaments. En canvi al final de l'experiment, es va poder observar un augment significatiu de l'activitat microbiana en els tractament de melassa-T34. Tot i així en la reproducció del *Meloidogyne* spp. en el tomàquet i enciam (Taula C, annex 1) no es van observar diferències entre tractaments.

4.2 Determinació de la qualitat i quantificació l'ADN

Abans de realitzar al qPCR es va dur a terme una electroforesis en gel d'agarosa al 0,8% per tal d'observar la integritat i la qualitat de l'ADN obtingut per observar que no s'havia degradat l'ADN en l'extracció i s'hi havia suficient quantitat per continuar amb el procés.. Els resultats es mostren a la Figura 5 on s'observa que l'ADN genòmic de les espècies *B. firmus* i T34 presenten una bona qualitat, ja que en els dos casos tenim una banda ben definida d'ADN.

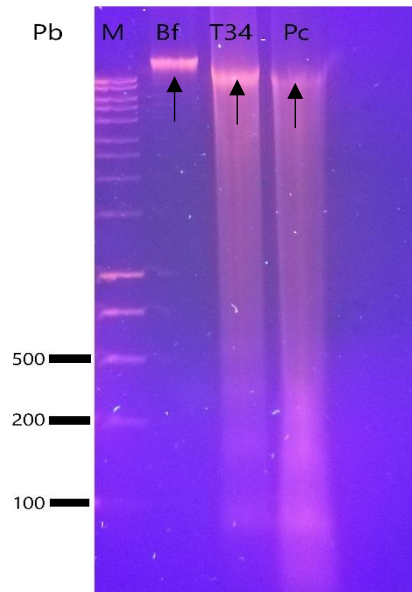


Figura 5: Gel d'electroforesi en 0,8% d'agarosa. Les bandes superiors que s'observen corresponen a l'ADN genòmic de: M marcador, Bf *Bacillus firmus*, T34 *Trichoderma asperellum* i Pc *Pochonia clamidosporia* (senyalitzades amb una fletxa).

També es va observar la qualitat de l'ADN genòmic de les mostres de sòl dels experiments de semicamp i de camp. En la Figura 9 es mostra un exemple d'aquests gels d'electroforesi, concretament al que correspon a l'extracció d'ADN del camp Martorell. En el gel s'observa com totes les mostres analitzades presenten una banda definida d'ADN genòmic.

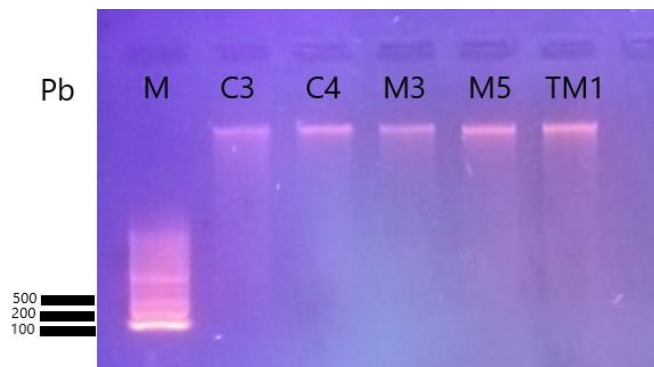


Figura 6: Gel d'electroforesi en 0,8% d'agarosa. Les bandes superiors que s'observen corresponen a l'ADN genòmic de les mostres del sòl de subparel·les de Martorell: Control 3 (C3), control 4 (C4), melassa 3 (M3), melassa 5 (M5) i melassa combinada amb T34 1 (TM1).

Un cop realitzada la extracció de l'ADN, es va quantificar l'ADN present en les mostres de microorganismes (Taula 6) i en les mostres del sòl (Taules 7 i 8):

Taula 6: Quantificació de l'ADN del microorganismes.

Microorganisme	Quantitat d'ADN (ng μL^{-1})
<i>Bacillus firmus</i>	4,16
<i>Bacillus firmus</i> 1	16,80
<i>Bacillus firmus</i> 2	7,68
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	13
<i>Trichoderma asperellum</i>	38,80

A la Taula 6 s'indiquen els valors de concentració d'ADN dels microorganismes (T34, *B. firmus* i *P. chlamydosporia*), els quals seran utilitzats per generar les rectes de calibratge de la qPCR.

Els valors de la quantificació de les mostres de sòl dels experiments de semicamp i camp es mostren a les Taules 7 i 8. Per poder quantificar la densitat dels fongs i bacteris es va determinar amb una quantitat inicial de 10 ng totals d'ADN.

Taula 7: Resultats de la quantificació d'ADN de l'experiment de melassa a diferents dosis, (-); significa que la concentració d'ADN per aquest tractament va ser molt baix i no es poder quantificar.

Dosis de melassa (mL m ⁻²)	<i>Trichoderma</i>	Quantitat d'ADN (ng μL^{-1})		
		Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3
0	SI	4,76	-	2,18
	NO	3,54	3,54	3,56
5	SI	3,88	2	4,50
	NO	6,10	4,64	3,46
10	SI	5,38	2,72	3,90
	NO	5,90	4,98	4,20
20	SI	4,40	4	10,5
	NO	5,84	4,98	4,20
40	SI	4,08	5,86	4,20
	NO	9,26	6,30	7,06

Taula 8: Resultats del camp de Castellbisbal i Martorell de la quantificació d'ADN del sòl a l'inici i final de cultiu tractats setmanalment amb 10 mL m⁻² de melassa (Melassa), combinat amb T34 (Melassa i *Trichoderma*) o no tractat (control). (-); significa que la concentració d'ADN per aquest tractament va ser molt baixa i no es poder quantificar.

		Quantitat d'ADN (ng µl ⁻¹)	
		Replica 1	Replica 2
MARTORELL			
Control parcel·la 3	Inicial	2,38	3,22
	Final	2,04	5,62
Control parcel·la 4	Inicial	2,90	2,44
	Final	3,60	5,68
Melassa parcel·la 3	Inicial	2,82	-
	Final	2,94	9,80
Melassa parcel·la 5	Inicial	3,74	2,44
	Final	3,24	2,88
Melassa + T34 parcel·la 1	Inicial	3,88	2,16
	Final	5,32	4,60
Melassa + T34 parcel·la 2	Inicial	-	4,24
	Final	2,20	3,86
CASTELLBISBAL			
Control parcel·la 2	Inicial	2,80	3,04
	Final	4,14	2,86
Control parcel·la 4	Inicial	2,70	2,92
	Final	2,90	3,38
Melassa parcel·la 3	Inicial	2,66	3
	Final	3,46	3,84
Melassa parcel·la 5	Inicial	3,10	2,06
	Final	3,40	2,96
Melassa + T34 parcel·la 2	Inicial	2,06	2,88
	Final	3,38	2,78
Melassa + T34 parcel·la 4	Inicial	5,20	2,64
	Final	2,92	2,70

4.3 Determinació de la densitat fúngica i bacteriana (qPCR)

4.3.1 Semicamp

L'estimació de la densitat fúngica i bacteriana del sòl mitjançant la qPCR es mostren en la Taula 9. En les plantes irrigades amb melassa es va observar un augment significatiu d'ADN de fong en les dosis de 20 i 40 mL m⁻² respecte a la dosi de 10 mL m⁻². Això és degut a que l'excessiva aplicació de melassa crea un medi anaeròbic, el qual és tòxic per la tomaquera i al mateix temps és una font nutrients per a la microbiota de l'entorn.

En la densitat bacteriana es va observar un augment significatiu en la dosis de 40 mL m⁻² de melassa en comparació als altres tractaments. Entre les dosis de 5 i 20 mL m⁻² i 10 i 0 mL m⁻², respectivament, no es van observar diferències significatives. Comparant els dos tractament (melassa i melassa-T34) es va observar que en el tractament de melassa-T34 hi havia una disminució significativa de la densitat bacteriana. Fet que podria haver-se donat perquè els mecanismes d'acció/colonització dels fongs podrien afectar als bacteris, i també per la colonització dels fongs induïda, juntament amb la melassa, la resistència vegetal induïda.

Taula 9: Densitat microbiana (ng d'ADN) del sòl tractat a diferents dosis de melassa (0, 5, 10, 20 i 40 mL m⁻²) sola o combinada *Trichoderma asperellum* (T34), 39 dies després de trasplantar en contenidors de 3 L.

		Dosi de melassa (mL m ⁻²)					
		<i>Trichoderma</i>	0	5	10	20	40
Fongs (ng ADN)	NO		0,14 ± 0,01*bc	0,14 ± 0,01*bc	0,11 ± 0c	0,15 ± 0,01*b	0,19 ± 0,01a
	SI		0,10 ± 0,01b	0,24 ± 0,03a	0,20 ± 0,03a	0,24 ± 0,01a	0,24 ± 0,02a
Bacteris (ng ADN)	NO		0,40 ± 0,02*c	0,56 ± 0,05*b	0,40 ± 0,02c	0,55 ± 0,05*b	0,79 ± 0,02*a
	SI		0,21 ± 0,03c	0,43 ± 0,05ab	0,31 ± 0,05b	0,40 ± 0,02ab	0,50 ± 0,03a

Nota: Cada dada és mitjana ± error estàndard de 10 repeticions. Dades en la mateixa columna i mateix paràmetre seguides de * , i dades en la mateixa fila seguides de diferent lletra indiquen diferències significatives segons el test no paramètric de Wilcoxon (P < 0,05).

4.3.2 Experiment de camp

4.3.2.1 Castellbisbal

Els resultats de la densitat fúngica i bacteriana de l'experiment del camp de Castellbisbal a l'inici i al final de l'experiment dels següents tractaments: control, melassa i melassa combinada amb T34, es mostren a la Taula 10. Els cultius plantats van a ser tomaquera i enciam.

Taula 10: Densitat microbiana del sòl (ng d'ADN) a l'inici i al final del cultiu tractats setmanalment amb 10 mL m⁻² de melassa (Melassa, combinar amb *Trichoderma asperelum*, T34 (melassa i *Trichoderma*) o no tractat (control)).

		Tractament		
		Control	Melassa	Melassa i <i>Trichoderma</i>
Fong (ng ADN)	Inicial	0,18 ± 0,02b*	0,30 ± 0,04a	0,22 ± 0,03ab
	Final	0,29 ± 0,02a	0,35 ± 0,01a	0,30 ± 0,03a
Bacteris (ng ADN)	Inicial	0,24 ± 0,01b*	0,42 ± 0,05a	0,33 ± 0,03ab
	Final	0,31 ± 0,02a	0,31 ± 0,01a	0,34 ± 0,02a

Nota: Cada dada és mitjana ± error estàndard de 5 repeticions. Dades en la mateixa columna i paràmetre seguides de * , i de la mateixa fila seguides de diferents lletres indiquen diferències significatives segons el test no paramètric de Wilcoxon (P < 0,05).

La densitat fúngica i bacteriana a l'inici de l'experiment en el camp de Castellbisbal va mostrar un augment significatiu del tractament de melassa respecte al control i en canvi no va diferir en al tractament de melassa-T34. Entre l'inici i el final del l'experiment s'observa un augment significatiu en el control, però podria ser degut a agents externs no contemplats, ja que únicament va ser regat amb aigua.

4.1.2.2 Martorell

Les dades referents a l'estimació de la densitat fúngica i bacteriana mitjançant qPCR es mostren a la Taula 11.

Taula 11: Densitat microbiana del sòl a l'inici i al final del cultiu tractats setmanalment amb 10 mL m⁻² de melassa (Melassa, combinar amb *Trichoderma asperelum*, T34 (melassa i *Trichoderma*) o no tractat (control)).

		Tractament		
		Control	Melassa	Melassa i <i>Trichoderma</i>
Fongs (ng ADN)	Inicial	0,24 ± 0,01a	0,29 ± 0,02a	0,41 ± 0,09a
	Final	0,24 ± 0,01a	0,30 ± 0,02a	0,32 ± 0,05a
Bacteris (ng ADN)	Inicial	0,35 ± 0,01a*	0,42 ± 0,05a	0,43 ± 0,06a
	Final	0,25 ± 0,02b	0,29 ± 0,02b	0,40 ± 0,04a

Nota: Cada dada és mitjana ± error estàndard de 4 repeticions. Dades en la mateixa columna i paràmetre seguides de *, i de la mateixa fila seguides de diferents lletres indiquen diferències significatives segons el test no paramètric de Wilcoxon (P < 0,05).

A l'inici del cultiu no es van observar diferències significatives entre els tractaments i el control. El mateix que es va observar en l'activitat microbiana. En canvi, en la densitat bacteriana, es va observar una disminució significativa en el tractament de control entre l'inici i el final de l'experiment, això podria ser degut a la incidència de factors externs tal i com s'ha esmentat en apartats anteriors.

5. Discussió

A l'actualitat, l'ús de nematicides degut a la seva alta toxicitat obliga a buscar alternatives en aquest projecte es proposa l'aplicació de melassa per afavorir el creixement de la microbiota de l'entorn i també l'ús de *Trichoderma asperellum* aïllat T34, ja que és antagonista dels nematodes i té la capacitat d'activar mecanismes de defensa de la planta.

A partir de la tècnica de FDA es va observar en l'experiment de semicamp amb plantes de tomàquet que l'activitat microbiana augmentava significativament amb l'aplicació de dosis creixents de melassa, mentre que l'índex d'agalles i la relació ous per planta disminuïa significativament. Per tant, l'aplicació de melassa redueix la capacitat reproductiva dels nematodes i la severitat de la malaltia (Sorribas et al., 2007). També es va observar que la combinació de melassa i el fong T34 provocava una disminució significativa de la reproducció i severitat del nematode, sent aquesta més elevada que en l'aplicació d'únicament melassa. De manera que es va poder considerar que l'aplicació dels dos agents (biològic i cultural) és un mètode més efectiu per combatre els nematodes, corroborant així lo descrit per Baños et al (2010). T34 és capaç d'induir mecanismes de resistència a les tomaqueres envers al nematode *Meloidogyne* (Pocorull, 2016), mentre que l'aplicació de melassa en condicions de semicamp s'ha descrit com un possible activador de la microbiota del sòl, la qual podria ser antagonista al nematode (Orellana, 2016). De manera que es podria corroborar que l'aplicació d'esmena orgànica (melassa) augmenta l'activitat microbiana al mateix temps que l'aplicació de T34 podria induir mecanismes de defensa, constituint la base dels sòls supressius (Sikora, 1992) dotant així a les plantes d'una major protecció enfront als nematodes. A més a més, la combinació de melassa i T34, va reflectir un augment significatiu de la densitat fúngica i una disminució de la densitat bacteriana. Aquest fet podria ser degut a que el *Trichoderma* és capaç de produir canvis en la composició de la microbiota natural del sòl ja que és capaç d'actuar directament com a paràsit (Cano, 2011) i també deguda a la seva velocitat de creixement, de manera que podria colonitzar l'entorn més ràpidament que els bacteris presents (Segarra Braunstein, 2008)

En l'experiment de camp de Castellbisbal també es va observar una disminució significativa de l'índex d'agalles i de la relació ous per planta en el tractament de melassa respecte el control, igual que en la investigació Haichao Guo (2017). Però entre l'inici i el final de l'experiment, en la densitat fúngica s'observa un increment d'aqueta i una disminució de la densitat bacteriana en l'aplicació del tractament de la melassa lo que concorda amb les investigacions de Baños et al (2010) i Vawdrey i Stirling (1997), ja que la melassa com s'ha esmentat anteriorment ajuda a l'activació de la microbiota del sòl, la qual també augmenta la microbiota antagonista als

nematodes i la descomposició de la melassa que pot actuar com a nematocida. Tot i així, sense l'observació d'una reducció significativa de la densitat bacteriana en el tractament de melassa-T34 respecte l'aplicació de la melassa sola, s'ha observat en estudis previs com els de Martínez-Medina et al (2016) i Medeiros et al (2017) que els fongs del gènere *Trichoderma* activen/indueixen mecanismes de defensa a la planta contra el *Meloidogyne*, corroborant així els nostres resultats obtinguts en semicamp però no els obtinguts en camp, ja que esperaríem que en el tractament combinat hi hagués hagut un increment significatiu de la densitat fúngica i de l'activitat microbiana degut a la suma d'efectes de la melassa i T34 envers als nematodes. Això podria ser degut, a que la dosi de T34 que es va utilitzar no era l'òptima per tenir efecte en els experiments de camp ja que en semicamp factors com la temperatura es troben controlats, mentre que en els experiments de camp no es poden controlar aquests factors externs els quals podrien afectar a l'activitat i viabilitat del fong T34 (Domingues et al. 2016), de fet s'ha vist que a temperatures elevades T34 perd activitat i disminueix el seu creixement (Mukherjee and Raghu, 1997).

En l'experiment de camp de Martorell no es van observar diferències en l'activitat i la densitat microbiana entre els tractaments de melassa i melassa-T34 a inici de l'assaig, però al final d'aquest, en el tractament de melassa-T34, es va observar un augment significatiu en l'activitat microbiana, però la reproducció del nematode no es va veure afectada, per tant podria ser degut a l'aparició d'un augment significatiu d'altres generes de nematodes com per exemple els *Aphelenchus* als quals son micòfags i per tant parasitarien i disminuirien la densitat fúngica de T34, donant explicació a l'augment de la densitat bacteriana observada (Pramer 1964).

6. Conclusions

1. En condicions de semicamp, amb l'aplicació de melassa a dosis de 10 mL m^{-2} combinada amb *Trichoderma* s'observa el major augment de l'activitat microbiana i de la densitat de fongs del sòl.
2. En les condicions de camp de Castellbisbal, amb l'aplicació de melassa a dosis de 10 mL m^{-2} augmenta l'activitat i la densitat fúngica, però amb el tractament combinat amb T34 no s'observa diferència respecte al tractament en melassa.
3. En condicions de camp de Martorell s'observa un augment en l'activitat microbiana, però no s'observen diferències entre la densitat microbiana.

7. Referències

Adam, G., and Duncan, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using Fluorescein Diacetate (FDA) in a range of soils.

Agrios, G.N. (2011). Plant pathology (Elsevier Academic Press).

Aktar, M.W., Sengupta, D., and Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards.

boletinagrario.com (2011). Melaza para actividad microbiana natural que reemplace el uso del metil bromido en la agricultura. <https://boletinagrario.com/dc-1849,melaza-para-actividad-microbiana-natural-que-reemplace-uso-metil-bromido-agricultura.html>. Visita 26/08/2018

Baños, Y. S., Concepción, A. B, Lazo, R.C., Gonzàlez, I. A., Morejón, L.P. (2010). Rev. Bras. de Agroecologia. 5(2): 224-233

Cano, M.A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. Rev. UDCA Actual. Divulg. Científica 14, 15–31.

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (Cuba) (1986). Revista de protección vegetal (Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria).

Chan, Y.-L., He, Y., Hsiao, T.-T., Wang, C.-J., Tian, Z., i Yeh, K.-W. (2015). Pyramiding taro cystatin and fungal chitinase genes driven by a synthetic promoter enhances resistance in tomato to root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Sci. 231, 74–81.

Domingues, M.V.P.F., Moura, K.E. de, Salomão, D., Elias, L.M., Patricio, F.R.A., Domingues, M.V.P.F., Moura, K.E. de, Salomão, D., Elias, L.M., i Patricio, F.R.A. (2016). Effect of temperature on mycelial growth of *Trichoderma*, *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*, as well as on mycoparasitism. Summa Phytopathol. 42, 222–227.

EU Pesticides database - European Comission. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>. Visita 11/10/2018.

Fernández, C., Rodríguez-Kábana, R., Warrior, P., i Kloepper, J.W. (2001). Induced Soil Suppressiveness to a Root-Knot Nematode Species by a Nematicide. Biol. Control 22, 103–114.

Flor Peregrín, M.E. (2013). Uso de agentes de control y protección biológica frente a nemátodos del género *Meloidogyne* en cultivos protegidos bajo plástico.

Francesc, X.S., Cèsar, O., i Soledad, V.-L. (2007). Nematodes fitoparàsits: epidemiologia i control. *Quad. Agrar.* 71–84.

García, S.N., i Navarro, A.B. (1996). Comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).

Green, V.S., Stott, D.E., i Diack, M. (2006). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biol. Biochem.* 38, 693–701.

Guo, H., Di Gioia, F., Zhao, X., Ozores-Hampton, M., Swisher, M.E., Hong, J., Kokalis-Burelle, N., DeLong, A.N., i Roskopf, E.N. (2017). Optimizing anaerobic soil disinfestation for fresh market tomato production: Nematode and weed control, yield, and fruit quality. *Sci. Hortic.* 218, 105–116.

Lazarovits, G., Conn, K., Abbasi, P., Soltani, N., Kelly, W., McMillan, E., Peters, R., i Drake, K. (2008). Reduction of potato tuber diseases with organic soil amendments in two Prince Edward Island fields.

Lopez-Llorca, L.V., Gómez-Vidal, S., Monfort, E., Larriba, E., Casado-Vela, J., Elortza, F., Jansson, H.-B., Salinas, J., i Martín-Nieto, J. (2010). Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genet. Biol.* 47, 342–351.

Mahdy, M. (2002). Biological control of plant parasitic nematodes with antagonistic bacteria on different host plants.

Martínez-Medina, A., Fernandez, I., Lok, G.B., Pozo, M.J., Pieterse, C.M.J., i Van Wees, S.C.M. (2017). Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytol.* 213, 1363–1377.

Medeiros, H.A. de, Araújo Filho, J.V. de, Freitas, L.G. de, Castillo, P., Rubio, M.B., Hermosa, R., i Monte, E. (2017). Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Sci. Rep.* 7, 40216.

Orellana Comes, Manuel (2015). Efecte de biopreparats formulats amb microorganismes del sòl i melassa sobre la reproducció del nematode *Meloidogyne* spp. i el desenvolupament vegetal en el cultiu de tomàquet. TFG ESAB-UPC.

Pereira e Silva, M.C., Dias, A.C.F., van Elsas, J.D., i Salles, J.F. (2012). Spatial and Temporal Variation of Archaeal, Bacterial and Fungal Communities in Agricultural Soils. *PLoS ONE* 7, e51554.

Plaguicides aliments.pdf. https://www.aspb.cat/wp-content/uploads/2016/07/Plaguicides_aliments.pdf Visita 10/10/2018.

Pocurull Domènech, Miriam (2016). Capacitat de fongs endòfits d'arrel per induir resposta sistèmica en vers *Meloidogyne* spp. en cultius de solanàcies i cucurbitàcies.

Pramer, D. (1964). Nematode-Trapping Fungi. *Science* 144, 382–388.

Segarra Braunstein, G. (2008). Inducció de resistència sistèmica a les plantes per l'agent de control biològic "*Trichoderma asperellum*" sota T34 o substrats supressius. Ph.D. Thesis. Universitat de Barcelona.

Sikora, R.A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystem for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30, 245-270.

Sorribas, F.J., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Galeano, M., i Valero, J. (2005). Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes. *Eur. J. Plant Pathol.* 111, 29–38.

Sorribas, F.X., Ornat, C., and Verdejo-Lucas, S. Nematodes fitoparàsits: epidemiologia i control.

Unión Europea, 2011. REGLAMENTO (UE) N1 1169/2011 DEL PARLAMENTO EUROPEO I DEL CONSEJO de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos... *Doce*, 2017, pp. 18-63.

Vawdrey, L.L., i Stirling, G.R. (1997). Control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) on tomato with molasses and other organic amendments. *Australas. Plant Pathol.* 26, 179.

Verdejo-Lucas, S. (2013). Detección de poblaciones virulentas de *Meloidogyne* frente al gen Mi de resistencia en tomate. 5.

Zeck, W.M. (1971). A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations. *Pflanz. Narchricht. Bayer.*, 24, 141-144.

Annex 1

INFORMACIÓ ADDICIONAL QUE CORRESPONEN AL PROJECTE

Taula A: Índex d'agalles, ous de *Meloidogyne* per planta amb 1 juvenil de *Meloidogyne* cm⁻³ en experiement de semi camp

		Dosi de melassa (mL m ⁻²)				
Trichoderma		0	5	10	20	40
Índex d'agalles	NO	3,10 ± 0,18a *	2,40 ± 0,22b	2 ± 0,21b	1,30 ± 0,15c	0 ± 0
	SI	3,70 ± 0,15a	2,40 ± 0,22b	1,60 ± 0,27c	1,30 ± 0,21c	0 ± 0
Ous/planta	NO	191021 ± 40079a	97542 ± 21059 b*	23295 ± 5521c *	1277 ± 570d	10 ± 10e
	SI	139982 ± 20183a	23983 ± 5265b	5209 ± 2454c	1691 ± 589c	30 ± 17d

Nota: Cada dada és mitjana ± error estàndard de 10 repeticions. Dades en la mateixa columna i mateix paràmetre seguides de * , i dades en la mateixa fila seguides de diferent lletra indiquen diferències significatives segons el test no paramètric de Wilcoxon (P < 0,05).

Taula B: Densitats de nematodes fitoparàsits en 250 cm⁻³ de sòl en el camp de Castellbisbal a l'inici (Pi) i final del cultiu (Pf), índex d'agalles i ous de *Meloidogyne* per planta en enciam i tomàquet en el camp de Castellbisbal a l'inici (Pi) i final del cultiu (Pf).

CASTELLBISBAL		Tractament		
		Control	Melassa	Melassa i Trichoderma
Nematodes				
Meloidogyne	Pi	46 ± 13a	61 ± 17a	80 ± 40a
	Pf	513 ± 182a	10 ± 4b	178 ± 103ab
Tylenchorhynchus	Pi	60 ± 8b	133 ± 22a	117 ± 19ab
	Pf	35 ± 9b	82 ± 33b	573 ± 47a
Aphelenchus	Pi	0 ± 0a	3 ± 3a	0 ± 0a
	Pf	3 ± 3b	65 ± 37ab	98 ± 53a
Aphelenchoides	Pi	3 ± 3a	3 ± 3a	6 ± 6a
	Pf	0 ± 0b	3 ± 3b	30 ± 10a
Tylenchus	Pi	29 ± 10b	54 ± 16ab	68 ± 4a
	Pf	23 ± 14b	76 ± 33ab	154 ± 53a
Cultiu			3,20 ± 0,4b	4,10 ± 0,3a
Enciam	Índex d'agalles	4 ± 0,1a	63332 ± 10997b	60654 ± 9971b
	Ous planta ⁻¹	132690 ± 8393a	3,40 ± 0,4b	4,30 ± 0,5ab
Tomàquet	Índex d'agalles	4,90 ± 0,5b	3,40 ± 0,4b	4,30 ± 0,5ab
	Ous planta ⁻¹	1455735 ± 249180a	556422 ± 196159b	765128 ± 208268ab

Nota: Cada dada és mitjana ± error estàndard de 5 repeticions. Dades en la mateixa columna i paràmetre seguides de *, i de la mateixa fila seguides de diferents lletres indiquen diferències significatives segons el test no paramètric de Wilcoxon (P < 0,05).

Taula C: Densitats de nematodes fitoparàsits en 250 cm³ de sòl en el camp de Martorell a l'inici (Pi) i final del cultiu (Pf), índex d'agalles i ous de *Meloidogyne* per planta en enciam i tomàquet en el camp de Martorell a l'inici (Pi) i final del cultiu (Pf).

MARTORELL		Tractament		
		Control	Melassa	Melassa i Trichoderma
Nematodes				
Meloidogyne	Pi	111 ± 50a	158 ± 38a	117 ± 60a
	Pf	57 ± 14a	16 ± 9a	26 ± 16a
Tylenchorhynchus	Pi	135 ± 52a	187 ± 53a	210 ± 69a
	Pf	269 ± 80a	249 ± 41a	456 ± 150a
Pratylenchus	Pi	58 ± 21a	99 ± 26a	46 ± 16a
	Pf	329 ± 92a	349 ± 109a	38 ± 14b
Aphelenchus	Pi	29 ± 7a	16 ± 10a	16 ± 6a
	Pf	74 ± 15b	89 ± 18b	162 ± 26a
Cultiu				
Enciam	Índex d'agalles	2,40 ± 0,3a	2,50 ± 0,2a	2,10 ± 0,3a
	Ous planta ⁻¹	7738 ± 1286a	6686 ± 2349a	6435 ± 3315a
Tomàquet	Índex d'agalles	2,50 ± 0,4a	2 ± 0,4a	2,90 ± 0,2a
	Ous planta ⁻¹	105155 ± 37896a	102380 ± 28981a	124118 ± 30096a

Nota: Cada dada és mitjana ± error estàndard de 4 repeticions. Dades en la mateixa columna i paràmetre seguides de *, i de la mateixa fila seguides de diferents lletres indiquen diferències significatives segons el test no paramètric de Wilcoxon (P < 0,05).

Taula D: Pes sec aeri i pes fresc radicular de les plantes de tomàquet susceptible cv. Bodar no inoculades ni tractades (control) i de les inoculades amb 1 juvenil de *Meloidogyne* cm⁻³ de sòl i tractades a diferents dosis de melassa (0, 5, 10, 20 i 40 mL/m²) sola o combinada amb *Trichoderma asperellum*, T34 39 dies després de trasplantar en contenidors de 3 L

		Dosis de melassa (mL/m ²)						
		<i>Trichoderma</i>	Control	0	5	10	20	40
Cultiu								
Pes sec aeri (g)	No		3,64 ± 0,17b	4,01 ± 0,12 a*	3,99 ± 0,18 ab*	3,36 ± 0,23c	2,85 ± 0,18c*	1,92 ± 0,08d
	Sí	-		4,84 ± 0,3a	4,93 ± 0,25a	3,66 ± 0,47b	3,37 ± 0,14b	1,90 ± 0,11c
Pes fresc radicular (g)	No		6,36 ± 0,35b	9,56 ± 0,52a	4,97 ± 0,54bc *	3,69 ± 0,44c	2,33 ± 0,21d	1,27 ± 0,13e
	Sí	-		7,91 ± 0,79a	6,98 ± 0,64a	4,57 ± 0,55b	2,62 ± 0,31c	1,12 ± 0,1d

Nota: Cada dada és mitjana ± error estàndard de 10 repeticions. Dades en la mateixa columna i paràmetre seguides de *, i de la mateixa fila seguides de diferents lletres indiquen diferències significatives segons el test no paramètric de Wilcoxon (P < 0,05).