



Escola Superior d'Agricultura
de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Efecte de *Trichoderma* sobre la supressivitat natural del sòl a *Meloidogyne*

Treball de Fi de Grau

Enginyeria de Sistemes Biològics



Autor: Miquel Ferro i Costa

Tutors: Nuria Escudero Benito

Francesc Xavier Sorribas Royo

Setembre del 2018

RESUM

Els nematodes del gènere *Meloidogyne* spp. són paràsits vegetals que es distribueixen arreu del món i afecten un gran nombre d'espècies, provocant grans pèrdues econòmiques en els cultius. Existeixen sòls supressius a *Meloidogyne* spp., és a dir, sòls en què els nematodes són presents i, en condicions favorables, la severitat de la malaltia i el desenvolupament de les poblacions són menors que en altres sòls. Dels diferents factors biòtics i abiòtics d'aquests sòls, la microbiota del sòl ha estat associada com a causa principal de la supressivitat, de la qual destaquen els fongs nematòfags.

En aquests sòls, l'ús de certs organismes antagonistes per a combatre malalties del sòl causades per fongs podria afectar la supressivitat al nematode. En aquest context, l'objectiu d'aquest treball va ser estudiar l'efecte de *Trichoderma asperellum* T34, sol o combinat amb un cultivar resistent a *Meloidogyne*, sobre la supressivitat d'un d'aquests sòls. Per dur a terme l'assaig, la meitat de plantes de tomàquet (*Solanum lycopersicum*) resistents (cv. Monika) i susceptibles (cv. Durinta) a *Meloidogyne* van ser tractades dos cops amb T34 a la dosi comercial recomanada, el primer al substrat del planter una setmana abans de trasplantar, i el segon just després de trasplantar en testos de 3 L que contenien una mescla 1:1 (sòl supressiu M10.55 : sorra de riera esterilitzada). L'altra meitat de les plantes no va rebre cap tractament. Totes les plantes van ser inoculades amb 1 juvenil de segon estadi de *Meloidogyne javanica* per cm³ de substrat just després de trasplantar i es van mantenir en bancades en hivernacle. Passats dos mesos del cultiu, es va determinar per cada planta el pes sec aeri (PSA), el pes fresc radicular (PFR), el nombre d'ous del nematode, el percentatge de parasitisme fúngic d'ous i les espècies implicades. Paral·lelament, es va estudiar la interacció *in-vitro* entre *T. asperellum* i *Pochonia chlamydosporia*, principal fong responsable de la supressivitat del sòl. A més, es van utilitzar eines de biologia molecular per a identificar *T. asperellum*. Els resultats de l'assaig van mostrar una menor reproducció del nematode en les plantes resistents tractades amb *T. asperellum* T34 respecte les no tractades. El percentatge de parasitisme d'ous va oscil·lar entre un 20 i 30%, sense trobar diferències entre plantes tractades o no. El principal fong aïllat dels ous va ser *P. chlamydosporia*, mentre que *Trichoderma* spp. només es va aïllar d'un dels ous parasitats. La interacció *in-vitro* entre aquests dos fongs no va evidenciar una inhibició destacable durant els 5 dies de cultiu dual. Mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), es va determinar que utilitzant els encebadors tag83B es pot identificar *T. asperellum*. També van servir per a identificar l'espècie de *Trichoderma* present en el sòl M10.55 com a component de la microbiota fúngica.

Així doncs, es considera que l'aplicació de la dosi comercial de *T. asperellum* T34 no afecta la supressivitat del sòl al nematode i, a més, redueix la reproducció del nematode en el cultivar resistent de tomàquet.

RESUMEN

Los nematodos del género *Meloidogyne* spp. son parásitos vegetales que se distribuyen por todo el mundo y afectan un gran número de especies, provocando grandes pérdidas económicas en los cultivos. Existen suelos supresivos a *Meloidogyne* spp., es decir, suelos en los que los nematodos están presentes y, en condiciones favorables, la severidad de la enfermedad y el desarrollo de las poblaciones son menores que en otros suelos. De los diferentes factores bióticos y abióticos, la microbiota del suelo ha sido asociada como causa principal de la supresividad, en la que destacan los hongos nematófagos.

En estos suelos, el uso de ciertos organismos antagonistas para combatir enfermedades del suelo causadas por hongos podría afectar la supresividad al nematodo. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de *Trichoderma asperellum* T34, solo o combinado con un cultivar resistente a *Meloidogyne*, sobre la supresividad de uno de estos suelos. Para llevar a cabo el ensayo, la mitad de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) resistentes (cv. Monika) y susceptibles (cv. Durinta) a *Meloidogyne* fueron tratadas dos veces con T34 a la dosis comercial recomendada, la primera al sustrato del semillero una semana antes de trasplantar, y la segunda justo después de trasplantar en tiestos de 3 L que contenían una mezcla 1:1 (suelo supresivo M10.55 : arena de riera esterilizada). La otra mitad de las plantas no recibieron ningún tratamiento. Todas las plantas fueron inoculadas con 1 juvenil de segundo estadio de *Meloidogyne javanica* por cm³ de sustrato justo después de trasplantar, y se mantuvieron en bancadas en invernadero. Pasados dos meses de cultivo, se determinó para cada planta el peso seco aéreo (PSA), el peso fresco radicular (PFR), el número de huevos del nematodo, el porcentaje de parasitismo fúngico de huevos y las especies implicadas. En paralelo, se estudió la interacción *in-vitro* entre *T. asperellum* y *Pochonia chlamydosporia*, principal hongo responsable de la supresividad del suelo. Además, se utilizaron herramientas de biología molecular para identificar *T. asperellum*. Los resultados del ensayo mostraron una menor reproducción del nematodo en las plantas resistentes tratadas con *T. asperellum* T34 respecto las no tratadas. El porcentaje de parasitismo de huevos osciló entre un 20 y 30%, sin variar entre plantas tratadas o no. El principal hongo aislado de los huevos fue *P. chlamydosporia*, mientras que *Trichoderma* sólo se aisló de uno de los huevos parasitados. La interacción *in-vitro* entre estos dos hongos no evidenció una inhibición destacable durante los 5 días de cultivo dual. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se determinó que usando los cebadores tag83B se puede identificar *T. asperellum*. También sirvieron para identificar la especie de *Trichoderma* presente en el suelo M10.55 como componente de la microbiota fúngica.

Así pues, se considera que la aplicación de la dosis comercial de *T. asperellum* T34 no afecta la supresividad del suelo al nematodo y, además, reduce su reproducción en tomate resistente.

ABSTRACT

Nematodes of genus *Meloidogyne* spp. are vegetal parasites that distribute around the world and affect a wide range of species, which causes great economic losses on crops. There are suppressive soils to *Meloidogyne* spp., which means, soils where the nematodes are present and, in favourable conditions, the disease severity and the population development are minor than in other soils. Among different biotic and abiotic factors, soil microbiota is been associated as the main cause of suppressiveness, in which stand out nematophagous fungi.

On these soils, the use of antagonist organisms to fight soil diseases produced by fungi may affect nematode suppressiveness. In this context, the aim of this work was to study the effect of *Trichoderma asperellum* T34, alone or combined with a *Meloidogyne* resistant cultivar on the suppressiveness of one of these soils. To carry out this assay, half of the tomato plants (*Solanum lycopersicum*) resistant (cv. Monika) and susceptible (cv. Durinta) to *Meloidogyne* were treated twice with T34 at recommended commercial dose, the first time a week before transplanting, and the second one just after the transplant in 3 L pots which contained a 1:1 mixture (suppressive soil M10.55 : sterilized river sand). The other half of plants did not receive any treatment. All plants were inoculated with 1 second stage juvenile of *Meloidogyne javanica* per cm³ of substrate just after transplanting. Two months later, we determined the dry aerial weight (PSA), fresh radicular weight (PFR), the number of nematode eggs, the fungal parasitism of the eggs and the involved species. At the same time, we studied the *in-vitro* interaction between *T. asperellum* and *Pochonia chlamydosporia*, main responsible fungus of soil suppressiveness. In addition, we used molecular biology tools to identify *T. asperellum*. The assay results showed a lower reproduction on resistant plants treated with *T. asperellum* T34 regarding on non-treated ones. The egg parasitism percentage oscillated between 20 and 30%, without varying between treated and non-treated plants. The main isolated fungus from eggs was *P. chlamydosporia*, while *Trichoderma* was only isolated from one parasited egg. The *in-vitro* interaction between those fungi did not demonstrate a prominent inhibition between them on 5 days of dual culture. By polymerase chain reaction (PCR), we determined that using primers tag83B, we could identify *T. asperellum*. They were also useful to identify the specie of *Trichoderma* present on the soil M10.55 as a component of fungal microbiota.

Therefore, we consider that the commercial dose application of *T. asperellum* T34 does not affect the nematode suppressiveness of the soil and, in addition, it involves a reduction of reproduction on resistant tomato cultivar.

Sumari

Índex de figures	6
Índex de taules	7
1. Introducció	8
1.1. <i>Meloidogyne</i>	8
1.2. Control de nematodes fitoparàsits	9
1.2.1. Control biològic	10
1.2.1.1. Sòls supressius	10
1.2.1.2. Microorganismes antagonistes a <i>Meloidogyne</i>	11
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	12
<i>Trichoderma</i>	13
1.3. Antecedents del treball	14
2. Objectius	16
3. Materials i mètodes	17
3.1. Efecte de T34 sobre la supressivitat del sòl a <i>Meloidogyne</i>	17
3.2. Interacció <i>in-vitro</i> entre <i>Pochonia chlamydosporia</i> i <i>Trichoderma</i>	18
3.3. Identificació de <i>Trichoderma</i> mitjançant PCR i validació d'encebadors	19
4. Resultats i discussió	21
4.1. Efecte de T34 sobre la supressivitat del sòl a <i>Meloidogyne</i>	21

4.2. Interacció <i>in-vitro</i> entre <i>Pochonia chlamydosporia</i> i <i>Trichoderma</i>	23
4.3. Identificació de <i>Trichoderma</i> mitjançant PCR i validació d'encebadors	26
5. Discussió	28
6. Conclusions	30
7. Bibliografia	31

Índex de Figures

- Figura 1: Cicle de vida de <i>Meloidogyne</i>	8
- Figura 2: Hifa de <i>P.chlamydosporia</i> parasitant ous de <i>Meloidogyne</i> després de 72 h d'incubació	12
- Figura 3: Hifa de <i>T. asperellum</i> T34 parasitant ous de <i>Meloidogyne</i> després de 72 h d'incubació	13
- Figura 4: Localització del sòl M10.55	14
- Figura 5: Inoculació dels nematodes el dia del trasplantament	17
- Figura 6: Esquema del mètode de cultiu dual	19
- Figura 7: Sembrada d'ous de <i>Meloidogyne</i> en medi Rosa de Bengala	22
- Figura 8: Fongs aïllats de la sembra d'ous del nematode	22
- Figura 9: Plaques del cultiu dual en medi PDA una setmana després del cultiu de <i>P. chlamydosporia</i> i 5 dies de <i>Trichoderma</i>	23
- Figura 10: Creixement temporal dels diferents aïllats de <i>P. chlamydosporia</i> enfrontats o no (controls) amb T34 en medi CMA	25
- Figura 11: Creixement temporal dels diferents aïllats de <i>P. chlamydosporia</i> enfrontats o no (controls) amb <i>Trichoderma</i> aïllada del sòl en medi CMA	25
- Figura 12: BLAST de l'encebador tag83B-F	26
- Figura 13: BLAST de l'encebador tag83B-R	26
- Figura 14: Gels de PCRs amb els encebadors β -tub i tag83B	27

Índex de taules

- Taula 1. Resultats de l'assaig. Pes sec aeri, pes fresc radicular, ous extrets de les arrels i parasitisme d'ous de les plantes dels diferents tractaments 21

1. Introducció

Aquest treball de fi de grau s'emmarca dins el projecte "Estrategias de gestión de germoplasma vegetal resistente a *Meloidogyne* para evitar la selección de virulencia", Ref. AGL2017-89785-R, concedit pel Ministerio de Ciencia Innovación y Universidades del Gobierno de España.

S'ha dut a terme amb el grup d'investigació GINEMQUAL (Gestió Integrada de Nematodes Fitoparàsits i dels Efectes sobre el Rendiment i Qualitat de la Collita) de l'ESAB (Escola Superior d'Agricultura de Barcelona). L'assaig principal s'ha realitzat a l'hivernacle de vidre d'Agròpolis, a Viladecans, mentre que el processament de les mostres i la resta d'experiments s'han fet en els laboratoris del DEAB (Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia), a l'ESAB.

1.1. *Meloidogyne*

La demanda d'aliments creix proporcionalment a la població mundial, i cada cop sembla més difícil d'assolir tenint en compte la capacitat productiva actual. Per això, cal que l'agricultura evolucioni per permetre una producció eficient i, alhora, sostenible. Davant aquest repte, es presenta la necessitat de trobar resposta a les problemàtiques que limiten la producció agrícola. Un dels principals condicionants del rendiment dels cultius són les plagues i els patògens vegetals, que en alguns casos poden comportar la pèrdua total de la collita. Un dels exemples de més importància són els nematodes fitoparàsits i, en concret, els nematodes agalladors o formadors de nòduls de les arrels, del gènere *Meloidogyne* (Perry, *et al.*, 2009).

Els nematodes del gènere *Meloidogyne* (Figura 1) són endoparàsits sedentaris obligats d'un ampli rang d'espècies vegetals i que es troben distribuïts arreu del món. Aquests nematodes redueixen tant el rendiment del cultiu com la qualitat de la collita (Eisenback i Triantaphyllou, 1991). *Meloidogyne* spp. passa la major part del seu cicle vital dins la planta. Els juvenils de segon



Figura 1. Cicle de vida de *Meloidogyne* (Eisenback, 1991).

estadi (J2) que surten de l'ou penetren l'arrel i se situen en el cilindre vascular, on establiran el lloc d'alimentació modificant un conjunt de cèl·lules, les cèl·lules gegants, al voltant del cap per a proveir-se d'aliment. Els llocs d'infecció seran l'inici de la formació de l'agalla. Després de la infecció, el nematode patirà tres mudes addicionals fins arribar a l'estadi adult. Les tres espècies més comunes arreu del món, *M. arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica*, es reproduïxen per partenogènesi. Els ous es dipositen en una massa gelatinosa que pot localitzar-se a l'exterior de l'arrel, quan l'atac no és sever, o dins, quan és sever i es formen agalles grosses o rosaris (Figura 1). Les plantes afectades tenen dificultats per absorbir aigua i nutrients, cosa que provoca una pèrdua de vigor i menor creixement, entre altres (Perry *et al.*, 2009).

Les pèrdues de producció solen ser majors en climes tropicals que en temperats degut a factors com la diversitat patogènica, les condicions ambientals, els recursos per combatre infeccions, etc. (De Waele i Elsen, 2007). Dins el gènere *Meloidogyne*, hi ha espècies ben adaptades a climes tropicals i subtropicals, com és el cas de *M. arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica*. Tot i que les condicions a l'àrea mediterrània poden limitar el seu desenvolupament en cultius de secà, en els cultius hortícoles de regadiu es donen condicions favorables d'humitat i temperatura, i més encara quan es cultiven en hivernacles (Llácer *et al.*, 1996).

1.2. Control de nematodes fitoparàsits

La gestió de nematodes fitoparàsits té com a objectiu minimitzar les pèrdues econòmiques que generen a través d'un conjunt d'actuacions destinades a reduir la densitat de nematodes (Wesemael *et al.*, 2011) i que sovint no contempla el manteniment de la biodiversitat (Perry *et al.*, 2009).

L'ús de nematicides segueix sent el mètode més utilitzat en agricultura convencional i probablement l'alternativa més econòmica i fàcil d'aplicar (Onkendi *et al.*, 2014). Tot i que alguns com el bromur de metil han estat prohibits per la contaminació i els riscos per la salut que generen, en alguns sistemes de producció, l'aplicació de nematicides sol ser essencial per a una producció de grans beneficis o per a exportar collites lliures de nematodes (Wesemael *et al.*, 2011).

Dit això, l'agricultura integrada i ecològica restringeix o prohibeix, respectivament, l'ús d'aquests productes químics. Per la qual cosa, cal utilitzar mètodes que incrementin o preservin la

diversitat microbiana del sòl, com poden ser l'ús d'esmenes orgàniques, la resistència vegetal o el control biològic.

La utilització de resistència vegetal és segurament el mètode de control més segur per al medi ambient. Un dels exemples és el gen *Mi* del tomàquet, responsable de la resistència a *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica* (Wesemael *et al.*, 2011). En cultius amb un alt nivell d'infestació de nematodes agalladors, la utilització de varietats resistents comporta una alta supressió de la plaga, a més d'un bon rendiment del cultiu. Tanmateix, el seu cultiu reiterat afavoreix la selecció de poblacions virulentes (Sorribas *et al.*, 2005), per la qual cosa cal combinar aquesta resistència vegetal amb altres mètodes de gestió com pot ser el control biològic, mitjançant l'aplicació d'antagonistes que actuen directament sobre el nematode o a través de la planta mitjançant la inducció de mecanismes de defensa vegetal.

1.2.1. Control biològic

La rizosfera és l'hàbitat de múltiples microorganismes que, en alguns casos, poden protegir de manera efectiva les plantes de patògens presents al sòl. Fins i tot, algunes espècies vegetals han desenvolupat estratègies de defensa basades en l'estimulació de poblacions d'aquesta microbiota antagònica a patògens (Weller *et al.*, 2002). Tot i així, l'efecte d'aquestes poblacions pot variar de ser negligible a supressiu totalment.

En el cas de *Meloidogyne* spp., destaquen entre aquests organismes antagònics els fongs nematòfags com *Pochonia chlamydosporia*, que parasita ous de nematodes de forma natural en diferents sòls agrícoles (Giné *et al.*, 2013). Aquest fong també s'ha detectat específicament en el que es coneix com a sòls supressius (Giné *et al.*, 2016).

1.2.1.1. Sòls supressius a *Meloidogyne*

Baker i Cook (1974) van definir els sòls supressius com aquells en què el patògen no s'estableix ni persisteix, s'estableix però causa poc o cap efecte negatiu, o s'estableix i infecta, però la malaltia no prospera. La supressivitat sol ser deguda a la combinació de l'efecte de la microbiota total del sòl (supressivitat general), la qual competeix amb el patògen pels recursos o bé provoca inhibició, així com als efectes d'un o més grups de microorganismes durant alguna etapa del desenvolupament del patògen (supressivitat específica) (Weller *et al.*, 2002). Un sòl pot tenir

activitat supressiva immediata si és inoculat amb una dosi alta d'antagonistes, però si es volen efectes a llarg termini aquests han de ser capaços d'establir-se i mantenir-se actius en el sòl (Collange *et al.*, 2011).

En el cas de sòls supressius a *Meloidogyne* spp., cal tenir en compte que aquests nematodes passen la majoria de la seva vida protegits dins l'arrel (Figura 1). Per tant, els antagonistes poden afectar-los directament si parasiten els ous quan estan a l'exterior en el cas que l'atac sigui poc sever, i/o al J2 quan migra pel sòl per penetrar altres arrels i, per tant, queda exposat als microorganismes del sòl, alguns dels quals queden adherits a la cutícula. Això comporta que aquests paràsits es transportin al lloc de la infecció del nematode i puguin alterar la seva reproducció (Adam *et al.*, 2014; Elhady *et al.*, 2017). Cal afegir que la femella de *Meloidogyne* diposita els ous en masses gelatinoses en la superfície de les arrels infectades, per la qual cosa els ous queden exposats i poden ser degradats pels microorganismes de la rizosfera (Perry *et al.*, 2009).

1.2.1.2. Microorganismes antagonistes a *Meloidogyne*

Dins els bacteris antagonistes, destaquen *Pasteuria penetrans* i *Pseudomonas fluorescens* (Collange *et al.*, 2011). *P. penetrans* és un paràsit de nematodes fitoparàsits amb una particular especificitat en la adhesió d'espores a juvenils de *Meloidogyne*, tot i que el seu potencial com a agent de control biològic pot no ser suficient davant altes densitats de nematodes (Wesemael *et al.*, 2011). El fet de ser un paràsit obligat és el principal limitant per a la seva producció i posterior aplicació a gran escala, a més del limitat rang d'hostes de cada soca de *P. penetrans* (Siddiqui i Mahmood, 1999).

Pel que fa als fongs nematòfags, s'han identificat diferents gèneres capaços d'atrapar, parasitar els ous o els nematodes, o produir toxines. Dels primers, destaquen els gèneres *Arthrobotrys* i *Monacrosporium* per la seva capacitat d'atrapar els nematodes en anells o xarxes. Els fongs paràsits d'ous probablement més efectius són *Purpureocyllium lilacinum* i *Pochonia chlamydosporia*, el primer més adaptat a climes tropicals i sòls àcids, mentre que el segon prefereix condicions més suaus. Altres gèneres de fongs amb efectes negatius sobre *Meloidogyne* són *Aspergillus*, que mostra toxicitat en juvenils de *M. incognita*, i *Trichoderma*, mitjançant enzims que degraden la coberta dels ous (Collange *et al.*, 2011; Sharon *et al.*, 2007). Els fongs paràsits d'ous també poden inhibir el creixement d'altres fongs fitopatògens (Monfort, 2004).

El mecanisme d'acció de *P. lilacinum* consisteix en el creixement de la hifa en la matriu gelatinosa on es troben els ous de nematodes fins que aquests es troben envoltats pel miceli. Així doncs, el parasitisme del fong es produeix per penetració de la cutícula dels ous mitjançant components enzimàtics com proteases, a més del factor mecànic (Siddiqui i Mahmood, 1996).

La distribució i abundància de fongs antagonistes de nematodes fitoparàsits a l'Estat espanyol s'ha dut a terme més intensament des de començaments de segle. Olivares i Lopez-Llorca (2002) van aïllar fongs paràsits d'ous en 9 de les 68 localitats mostrejades, sent el més abundant *Pochonia chlamydosporia*. Giné *et al.*(2013), en canvi, van trobar aquest fong parasitant ous de nematodes en un 100% de les parcel·les destinades a producció ecològica i en un 73% de parcel·les de producció integrada.

Pochonia chlamydosporia

P. chlamydosporia té un mecanisme similar: forma apressoris, que són estructures especialitzades per a l'adhesió del fong als ous de nematode. Un cop adherit a la coberta de l'ou, la degradació d'aquest es du a terme mitjançant proteases i quitinases, enzims necessaris per a la degradació dels principals components de la coberta, proteïnes i quitina (Figura 2). Es troba en nombrosos sòls supressius a nematodes i pot viure com a sapròfit en absència d'hostes (Manzanilla-López *et al.*, 2013).

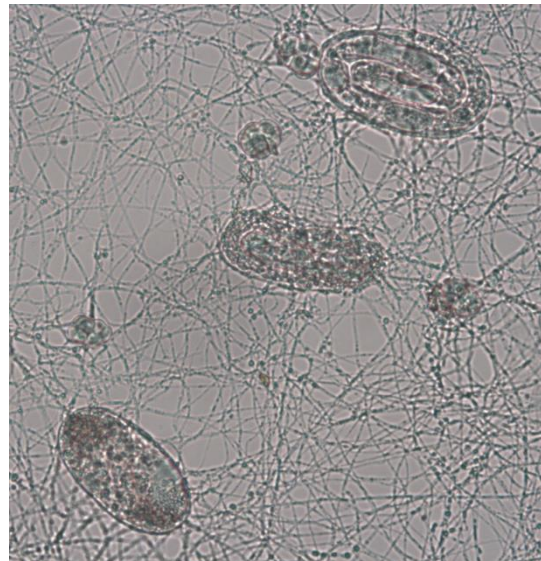


Figura 2. Hifa de *P. chlamydosporia* parasitant ous de *Meloidogyne javanica* després de 72 h d'incubació in-vitro (100X).

A més, *P. chlamydosporia* és capaç de colonitzar les arrels de certs cultius, possiblement com a estratègia de supervivència, fet que provoca una resposta vegetal de defensa que promou l'arrelament. A més, durant aquesta colonització endòfita, expressa enzims implicats en la infecció d'ous, encara que els nematodes no estiguin presents (Escudero i Lopez-Llorca, 2014).

En cultius com l'ordi, la colonització de les arrels per *P. chlamydosporia*, a part d'incrementar la longitud radicular i el seu pes fresc, també ho fan les activitats proteolítiques i, en menor mesura, quitinases i glucanases (Monfort, 2004).

Trichoderma

El mode de vida d'aquest gènere de fongs es basa en tres tipus de nutrició: la saprotrofia, la micotrofia i la dependència de sucres i exsudats derivats de plantes. La majoria d'espècies són capaces de degradar la cel·lulosa mitjançant cel·lulases. En horticultura, s'utilitzen diferents espècies per al control biològic de patògens fúngics, principalment, com ara *T. asperellum*, *T. atrovirdie*, *T. harzanium*, *T. virens* i *T. viride* (López-Bucio *et al.*, 2015).

L'aplicació de *Trichoderma* al sòl, llavors o superfícies de plantes augmenta la solubilitat de nutrients i la capacitat de captació de l'arrel, cosa que millora el creixement i desenvolupament vegetal. Això es deu a l'alteració de l'arquitectura radicular induïda pel fong i a l'exsudació de substàncies que augmenten la disponibilitat de nutrients, com poden ser àcids orgànics o sideròfors, que permeten la incorporació de ferro a les cèl·lules. A més, les plantes que han sigut colonitzades mostren un augment de nivells endògens d'hormones (auxines, etilè i gibberel·lines), enzims, antioxidants i altres compostos que milloren la tolerància a estressos ambientals (López-Bucio *et al.*, 2015).

Més enllà d'estimular el desenvolupament vegetal, *Trichoderma* també indueix una resistència sistèmica a la invasió de patògens vegetals, és a dir, un estat de resistència o tolerància que es deu als efectes de reguladors del sistema immunitari vegetal com són l'etilè i l'àcid jasmònic i salicílic (Mukherjee *et al.*, 2012). En tomàquet susceptible cv. Durinta, *T. asperellum* T34 i *T. harzanium* T22 indueixen una resposta de la planta front a *Meloidogyne* (Pocurull, 2016).

A part d'aquestes propietats, ja fa temps que es coneix la capacitat nematòfaga de diferents espècies de *Trichoderma* (Figura 3). Pel que fa al control de *Meloidogyne incognita*, dues soques comercials de *Trichoderma* han resultat notablement efectives. En la utilització de soques natives de *T. asperellum* o *T. harzanium*, entre d'altres, Affokpon *et al.* (2011) demostren que l'aplicació del fong en tomàquet abans de plantar redueix significativament la densitat de juvenils J2, la producció d'ous i, en menor

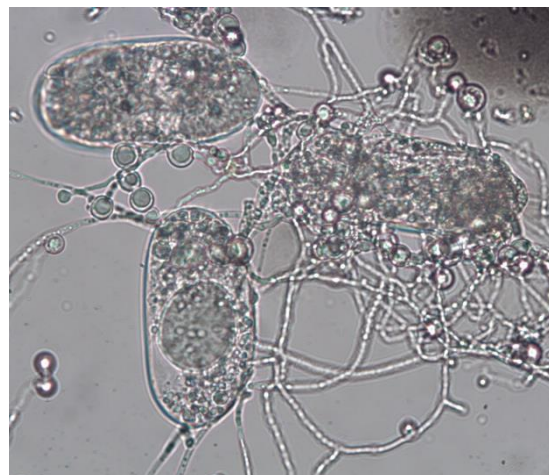


Figura 3. Hifa de *T. asperellum* T34 parasitant ous de *Meloidogyne javanica* després de 72 h d'incubació in vitro (100X).

mesura, l'agallament. Altres estudis també destaquen que els efectes estimulants de *Trichoderma* són acumulables a l'aplicació d'altres agents de control biològic de *Meloidogyne*,

com *Acremontium strictum* i *P. lilanicus* (Goswami *et al.*, 2008), o bé *P. chlamydosporia* i *Globus clarum* (Puertas *et al.*, 2006).

Trichoderma també és efectiu per al control de *M. javanica* (Sharon *et al.*, 2001). En tomàquet susceptible, la inoculació del fong redueix la penetració i alimentació del nematode, a més de l'eclosió dels ous, probablement per acció de quitinases i proteases (Sahebani i Hadavi, 2008). Sharon *et al.* (2007) suggereixen que la matriu gelatinosa de les masses d'ous, que es considera una protecció contra microorganismes, permet el desenvolupament d'algunes espècies de *Trichoderma* en la seva superfície. També observen una relació directa entre el parasitisme a nematodes i activitat proteolítica dels aïllats del fong.

1.3. Antecedents del treball

El sòl que s'ha utilitzat en el present treball (Figura 4), denominat M10.55, va ser prèviament caracteritzat com a supressiu a *Meloidogyne* (Giné *et al.*, 2013, 2016).



En estudiar la presència natural de fongs paràsits d'ous de *Meloidogyne* en diferents localitats (Giné *et al.*,

Figura 4. Localització del sòl M10.55 (Alcanar, Tarragona).

2013), es van identificar una sèrie d'espècies que parasitaven o eren antagonistes d'ous de nematodes agalladors (*Meloidogyne*). La única espècie que es va poder relacionar directament amb el parasitisme d'ous va ser *P. chlamydosporia*; que, en el sòl M10.55, era aïllada d'un 61% dels ous de *Meloidogyne*.

En un estudi posterior (Giné *et al.*, 2016), es va determinar el seu nivell de supressivitat. En dur a terme el mateix assaig en torreta amb sòl esterilitzat i no esterilitzat, es va trobar que el nombre d'ous per planta era significativament superior en el primer cas, la qual cosa destacava el paper de la microbiota antagonista. L'únic paràsit d'ous identificat va ser *P. chlamydosporia*, tant en experiments en camp com en torreta, en tots dos casos amb un alt percentatge de parasitisme, tot i que en camp va anar decreixent degut a les variacions de poblacions per les rotacions de cultius i certes pràctiques agronòmiques. També es va determinar el parasitisme

in-vitro, que fluctuava entre 56'5 i 93'7%, únicament amb aïllats de *P. chlamydosporia*. Així doncs, es va determinar que el sòl M10.55 era supressiu a *Meloidogyne*.

Recentment, en estudiar la microbiota d'aquest sòl capaç de colonitzar arrels de cogombre i de tomàquet (Burgués, 2018), es va trobar *Trichoderma* spp. colonitzant la superfície d'arrels de cogombre, però no de tomàquet.

L'ús d'agents de control biològic com *T. asperellum* T34 en agricultura ecològica i integrada és fonamental per tal de combatre fongs fitopatògens. Al mateix temps, convé garantir que aquests formulats biòtics no afecten la microbiota del sòl i, per tant, la supressivitat natural d'aquests sòls front a patògens com *Meloidogyne*.

Com s'ha explicat anteriorment, combinar l'ús de cultivars resistents amb agents de control biològic pot reduir la selecció de poblacions virulentes de patògens a aquests cultivars (Sorribas, *et al.* 2005). Per això, en aquest treball s'ha combinat l'aplicació de *T. asperellum* T34 sol o amb un cultivar resistent a *Meloidogyne*. El potencial efecte nematocida d'aquest fong, a banda del de control de patògens fúngics, podria contribuir a disminuir la selecció de virulència en el cultivar resistent.

En paral·lel a l'experiment principal, s'ha estudiat la interacció de *Trichoderma* i *P. chlamydosporia* en un cultiu *in-vitro* per a determinar si existeix inhibició en algun dels fongs en enfrontar-los i, d'aquesta manera, relacionar aquests resultats amb l'assaig *in-vivo*.

D'altra banda, existeix la necessitat de disposar d'eines de biologia molecular per tal de poder identificar, en el present treball o en posteriors, la soca T34 de *T. asperellum*, per això s'han buscat i utilitzat encebadors específics per aquesta espècie, i s'ha dut a terme una reacció en cadena de la polimerasa (PCR) amb diferents espècies de *Trichoderma* (T34 entre elles) per tal de determinar que els encebadors permeten identificar T34 discriminant altres espècies.

2. Objectius

L'objectiu d'aquest treball va ser determinar l'efecte de *Trichoderma asperellum* T34 sol o combinat amb un cultivar de tomàquet resistent a *Meloidogyne* sobre la supressivitat del sòl al nematode.

Els objectius específics van ser:

- Avaluat l'efecte de la soca T34 de *Trichoderma asperellum* sobre la supressivitat natural del sòl a *Meloidogyne*.
- Comprovar la capacitat de la soca T34 de *T. asperellum* de parasitar ous de *Meloidogyne*.
- Estudiar la interacció *in-vitro* entre *Trichoderma* i *Pochonia chlamydosporia*.
- Utilitzar eines de biologia molecular per a identificar T34.

3. Materials i mètodes

3.1. Efecte de T34 sobre la supressivitat del sòl a *Meloidogyne*



Figura 5. Inoculació dels nematodes el dia del trasplantament.

El sòl M10.55, caracteritzat prèviament com a supressiu a *Meloidogyne* (Giné *et al.*, 2016), es va utilitzar com a substrat per l'assaig. El sòl provenia de cultiu ecològic en hivernacle situat a Alcanar (Tarragona). Es van prendre mostres per dur a terme l'extracció de nematodes a partir

de dues submostres de 250 cm³ de sòl mitjançant el mètode de centrifugació-flotació (Jenkins, 1964). Posteriorment, el sòl es va mesclar amb sorra de riu estèril en proporció 1:1 de volum i es va distribuir 2'5 L per torreta.

L'inòcul de nematodes per a l'assaig es va obtenir de diferents poblacions de *Meloidogyne javanica* mantingudes a Agròpolis pel grup de recerca en Patologia Vegetal de l'ESAB. Es van extreure els ous mitjançant una maceració de les mateixes en una solució de lleixiu comercial al 5% (Hussey i Barker, 1973) i es van dipositar en safates de Baermann (Whitehead i Hemming, 1965) per fer-los ecllosionar i, així, obtenir juvenils de segon estadi com a inòcul.

L'assaig va constar de quatre tractaments producte de la combinació del cultiu de plantes de tomàquet (*Solanum lycopersicum*) resistents (cv Monika) o susceptibles (cv Durinta) al nematode, amb o sense aplicació de la soca T34 de *T. asperellum*.

La soca T34 de *T. asperellum*, proporcionada per la Dra. M^a Isabel Trillas de la Universitat de Barcelona, es va aplicar a raó de 4 ml de suspensió fúngica (0'01 g T34 · L⁻¹) per planta una setmana abans del trasplantament del planter al test i una altra el mateix dia del trasplantament. Les plantes no tractades van rebre el mateix volum d'aigua. Un cop trasplantades les tomaqueres, el sòl va ser inoculat amb 1 J2 cm⁻³ de sòl (Figura 5), dipositats en dos forats oposats a 2 cm de la tija i 3 cm de fondària. Cada combinació cultivar de tomàquet-tractament de T34 es va repetir 15 vegades.

Les plantes es van mantenir en bancades a l'hivernacle de vidre d'Agròpolis des del 23 de març al 21 de maig de 2018. En finalitzar l'assaig, es va determinar el pes fresc de les arrels i el pes de la part aèria assecada a 70°C durant una setmana.

Per a determinar el percentatge de parasitisme d'ous, es van extreure 5 masses d'ou de cada planta i es van dipositar en un tub Eppendorf amb 100 µL d'aigua destil·lada estèril. Es van disgregar les masses amb un èmbol i es va afegir aigua fins a arribar a 1 mL de suspensió d'ous, de la qual es van prendre alíquotes de 333 µL i es van dipositar en tres càpsules de Petri amb medi Rosa de Bengala (casa comercial Microkit; 5 g de peptona L⁻¹, 10 g de glucosa L⁻¹, 0'5 g de sulfat de magnesi L⁻¹, 1 g de fosfat potàssic L⁻¹, 0'06 g de rosa de bengala L⁻¹, 0'2 g de cloranfenicol L⁻¹, 15 g d'agar bacteriològic L⁻¹) amb els antibiòtics clorotetraciclina (50 mg L⁻¹) i estreptomina (50 mg L⁻¹) per restringir el creixement únicament als fongs que haguessin colonitzat els ous, i es van incubar a 25 °C i foscor. L'avaluació del parasitisme es va fer al cap de 24 i 48 h d'incubació. Es va determinar el percentatge de parasitisme mitjançant el recompte d'ous parasitats respecte el total d'ous sembrats a la placa de Petri. Una representació d'ous parasitats que presentaven característiques semblants van ser transferits individualment en altres plaques amb el mateix medi per aïllar el fong i identificar-lo posteriorment segons les característiques morfològiques de la colònia. De la resta d'arrels, es van extreure els ous segons el mètode anterior (Hussey i Barker, 1973) i van ser recomptats. Del nombre total d'ous, es va descartar el percentatge d'ous parasitats per obtenir el nombre d'ous viables.

Les dades es van analitzar amb el programari estadístic JMP 8.0 de SAS Institute. En considerar que no presentaven una distribució normal, es van sotmetre al test no paramètric de Wilcoxon ($P > 0'05$) per avaluar l'efecte de l'aplicació de T34 per a cada varietat de tomàquet, o entre varietats segons tractament, sobre la reproducció del nematode, el percentatge de parasitisme i la productivitat vegetal.

3.2. Interacció *in-vitro* entre *Pochonia chlamydosporia* i *Trichoderma*

Es va estudiar el creixement *in-vitro* de diferents aïllats de *P. chlamydosporia*, com a principal responsable de la supressivitat del sòl, en presència de dues soques *Trichoderma asperellum* (una soca aïllada del sòl (Burgués, 2018) i T34, per separat) en medis de cultiu PDA ("Potato Dextrose Agar", casa comercial Microkit; 4 g d'extracte de patata L⁻¹, 20 g de dextrosa L⁻¹, 15 g d'agar bacteriològic L⁻¹) i CMA ("Corn Meal Agar", casa comercial Microkit; 2 g d'extracte de blat

de moro L^{-1} , 15 g d'agar bacteriològic L^{-1}), seguint el mètode de cultius duals de Monfort (2004) mitjançant el qual se situarien els dos fongs enfrontats en una placa de Petri (Figura 6). Com el creixement de *P. chlamydosporia* és més lent que el de *T. asperellum*, es va afegir el segon tres dies més tard que el primer. Les plaques van ser incubades a 25 °C i foscor durant una setmana des de la inoculació de *P. chlamydosporia* i es va mesurar el radi de creixement d'ambdós fongs cada dia des de la inoculació de *T. asperellum*. Els controls es van dur a terme sense inocular aquest últim fong.

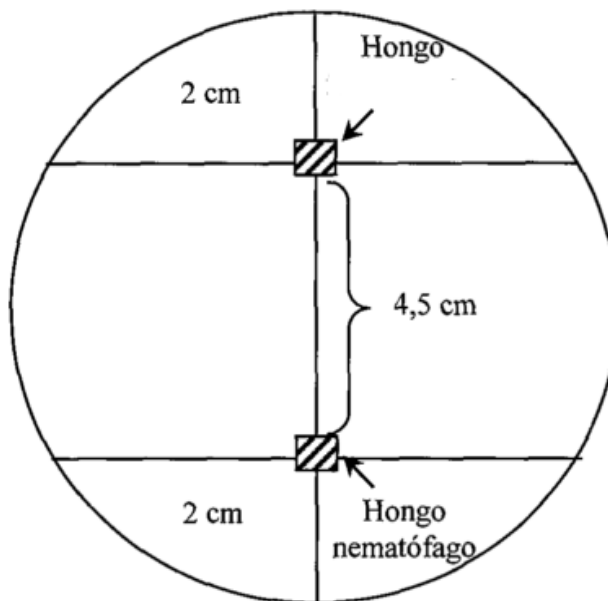


Figura 6. Disposició de l'inòcul dels fongs a la placa de Petri en el mètode de cultiu dual (Monfort, 2004).

Es van fer 5 repeticions per aïllat de *P. chlamydosporia* (4 aïllats procedents del sòl M10.55) i *Trichoderma* (2 aïllats): tres de cultiu dual i dues pel control del primer. Tot i mesurar les plaques de CMA i PDA, només es van utilitzar els valors de les primeres, mentre que les de PDA es van utilitzar per fer un anàlisi visual.

3.3. Identificació de *Trichoderma* mitjançant PCR i validació dels encebadors

Es va realitzar un anàlisi a nivell de seqüència (BLAST) en la base de dades de l'NCBI per observar la coincidència amb els encebadors tag83B-F (5'-CACCTACTACCAGCCAAATCC-3') i tag83B-R (5'-CAGAACTGCCGGAACAGGAG-3'), específics per a un gen de *Trichoderma asperellum* (Marcello *et al.*, 2010).

Les mostres d'ADN es van obtenir de miceli dels tres aïllats de *Trichoderma* disponibles (*T. harzanium* T22, *T. asperellum* T34 i l'aïllat del sòl) cultivats en PDB ("Potato Dextrose Broth", casa comercial Scharlau; 4 g de peptona de patata L^{-1} , 20 g de glucosa L^{-1}) a 25 °C i foscor durant una setmana. L'extracció d'ADN es va dur a terme a partir del miceli liofilitzat seguint el protocol descrit per Lopez-Llorca *et al.* (2010).

Les condicions per a la PCR van ser: 95 °C durant 15 segons, 60 °C durant 1 min i 72 °C durant 15 s, per 40 cicles. Es va dur a terme la PCR en un volum total de 50 µL: 5 µL de Buffer (20 mM de MgCl₂), 1 µL de dNTPs (10 mM), 0'5 µL de cada encebador (100 µM), 0'25 µL de Taq Polimerasa (5 unitats µL⁻¹), 1 µL de la mostra d'ADN i 41'75 µL d'aigua.

El producte de la PCR es va visualitzar en un transiluminador després d'una electroforesi en gel d'agarosa al 2% amb Gel Red com agent intercalant que s'uneix específicament a l'ADN i permet observar-lo mitjançant llum UV.

4. Resultats

4.1. Efecte de T34 sobre la supressivitat del sòl a *Meloidogyne*

En el sòl inicial es van identificar alguns nematodes fitoparàsits dels gèneres *Tylenchorynchus*, *Tetylenchus*, *Ditylenchus*, *Telotylenchus* o *Pratylenchus*, però cap exemplar de *Meloidogyne*.

La reproducció del nematode en el cultivar resistent de tomàquet sense tractar va ser un 37% la registrada en el cultivar susceptible sense tractar, mentre que en tractar amb T34 va ser del 23%. L'aplicació de *T. asperellum* T34 en el cultivar de tomàquet resistent va disminuir la reproducció del nematode en un 58% respecte el no tractat ($P < 0'05$), però no es van detectar diferències significatives en el cultivar susceptible. L'aplicació de la soca T34 de *T. asperellum* no va afectar el percentatge de parasitisme d'ous, oscil·lant entre el 20 i 30% (Taula 1). Aquest valor va ser inferior a l'obtingut en estudis anteriors (Giné *et al.* 2013, 2016).

La utilització del cultivar resistent també va comportar una reducció ($P < 0'05$) del nombre d'ous respecte el susceptible, independentment de l'aplicació o no de T34.

Taula 1. Pes sec aeri (PSA), pes fresc radicular (PFR), ous extrets de les arrels i parasitisme d'ous de les plantes inoculades amb 1 J2 de *M. javanica* per cm^3 de sòl i tractades o no amb T34. Mitjana \pm Error Estàndard.

Tractament	PSA (g)	PFR (g)	Ous no parasitats ($\cdot 10^3$)	Parasitisme (%)
Resistent	19,24 \pm 0,78	13,12 \pm 0,72*	24 \pm 4,3 *#	26,50 \pm 2,49
Resistent + T34	19,99 \pm 0,79	12,55 \pm 0,69*	10,2 \pm 0,6 *#	27,47 \pm 3,74
Susceptible	21,35 \pm 1,13	22,92 \pm 1,18	64,8 \pm 8,7	25,37 \pm 3,18
Susceptible + T34	20,70 \pm 1,09	21,21 \pm 2,10	44,3 \pm 7,5	28,87 \pm 1,80

S'indiquen les diferències significatives ($P < 0'05$) entre cultivars (*) i entre aplicació o no de T34 pel mateix cultivar (#).

En les plantes sense aplicació de T34, tots els fongs aïllats (Figures 7 i 8) es van identificar com a *P. chlamydosporia*. En el cultivar susceptible amb aplicació de T34, de 20 fongs aïllats es van trobar 18 de *P. chlamydosporia* i 2 sense identificar. Pel que fa al resistent amb T34, també es van aïllar 18 de *P. chlamydosporia*, un sense identificar i un que va ser identificat com a *Trichoderma*.

No hi va haver diferències en quant a biomassa seca aèria entre cultivars, però sí respecte al pes fresc radicular, sent major en el tomàquet susceptible cv. Durinta que en el resistent cv. Monika a causa de les agalles causades pel nematode.

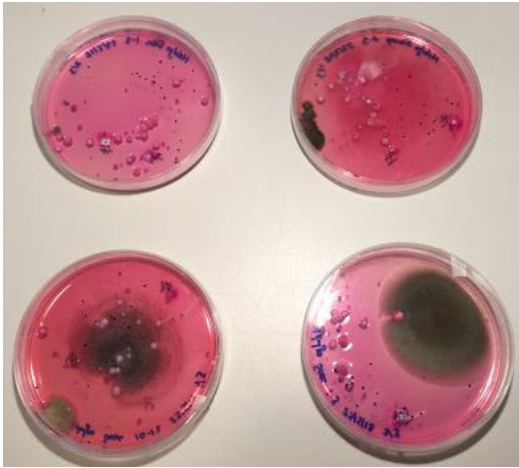


Figura 7. Sembrada d'ous de *Meloidogyne* en medi Rosa de Bengala.



Figura 8. Fongs aïllats de la sembrada dels ous de nematode.

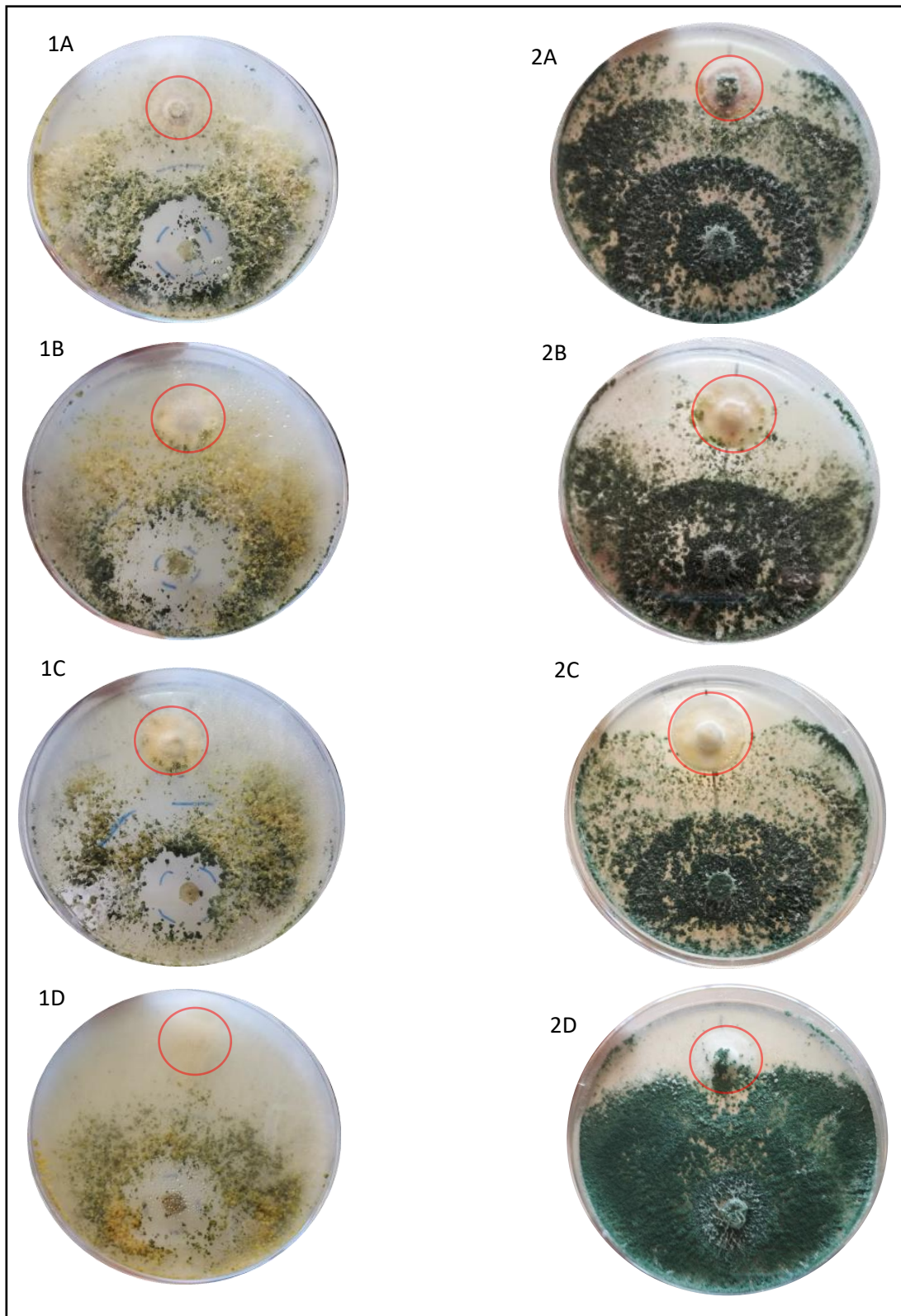
4.2. Interacció *in-vitro* entre *Pochonia chlamydosporia* i *Trichoderma*

Figura 9. Plaques del cultiu dual en medi PDA una setmana després del cultiu de *P. chlamydosporia* (cercle vermell) i 5 dies de *Trichoderma*. El nombre indica l'aïllat de *Trichoderma* (1- T34, 2- provinent del sòl M10.55) i la lletra l'aïllat de *P. chlamydosporia*.

En la Figura 9, es pot observar com en tots els casos la colonització de la placa de Petri per *Trichoderma* és total, i en algun cas fins i tot per sobre de *P. chlamydosporia*. Tot i així, a simple vista es veu com el desenvolupament dels dos aïllats de *Trichoderma* no és uniforme: la pigmentació disminueix al voltant de *P. chlamydosporia*, en major mesura en la soca T34 (aïllat 1, Figura 9), que passa d'un color verd al voltant de la inoculació de *Trichoderma* al blanc a mesura que el fong s'apropa a *P. chlamydosporia*. En la soca de *Trichoderma* aïllada del sòl M10.55 (aïllat 2, Figura 9) també s'observa una disminució en pigmentació, tot i que menys progressiva que en l'altre cas.

Pel que fa al creixement temporal (Figura 10 i 11), no podem parlar d'inhibició a curt termini de *P. chlamydosporia* per part de *Trichoderma*, ja que l'evolució dels controls és equiparable a la dels cultius duals. A més, no s'observa cap canvi a partir del dia 3, quan s'afegeix *Trichoderma* a la placa de cultiu. Tot i així, passats els 7 dies, els controls de *P. chlamydosporia* seguien creixent, a diferència dels cultius duals, en què aquest fong no va créixer més, ja fos degut al caràcter micòtrof de *Trichoderma*, o per la competència d'aquest i l'esgotament progressiu dels nutrients.

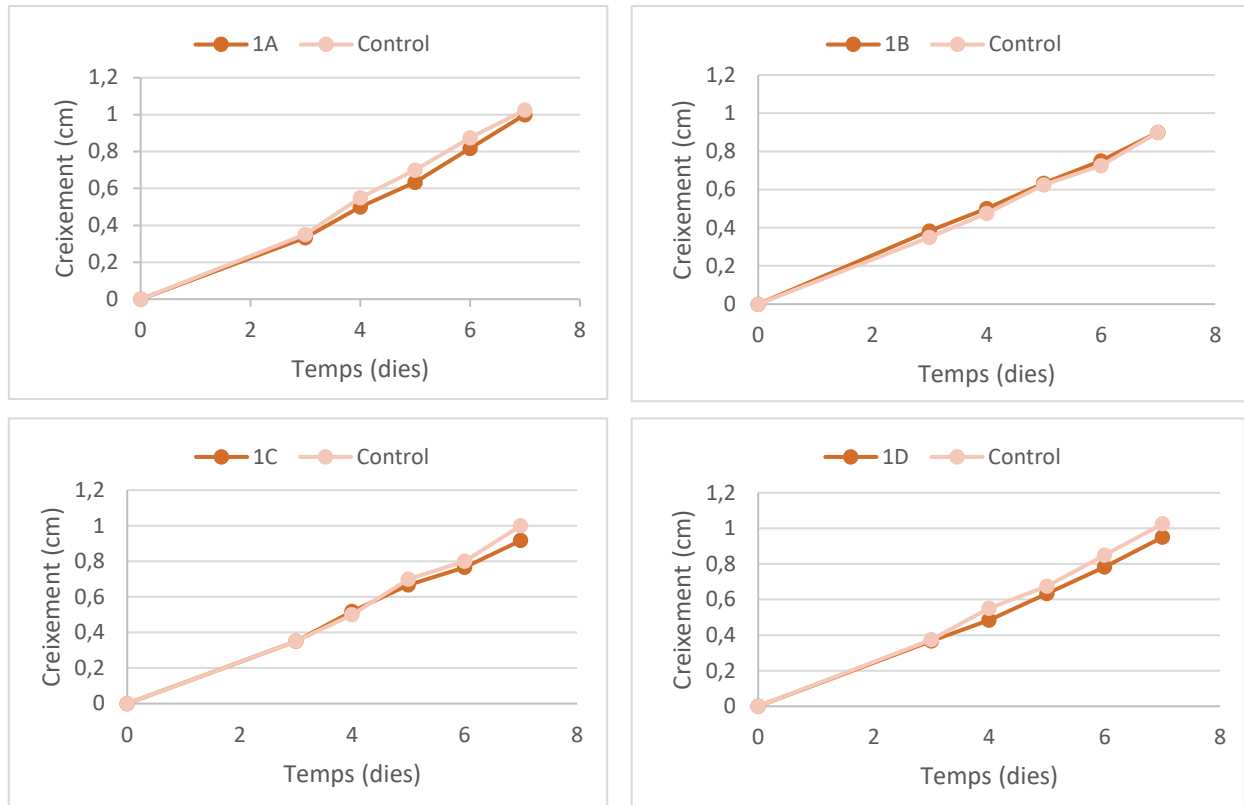


Figura 10. Creixement temporal dels diferents aïllats de *P. chlamydosporia* enfrontats o no (controls) amb T34 en medi CMA.

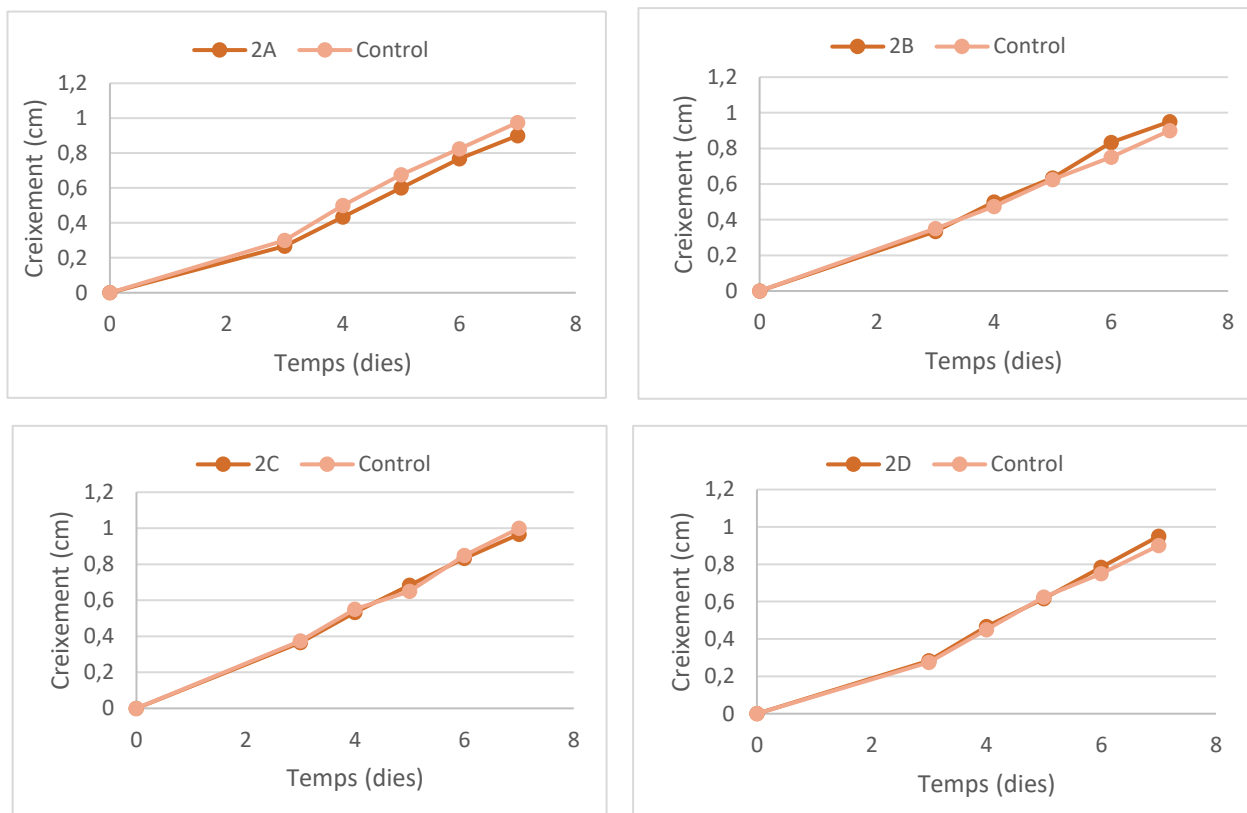


Figura 11. Creixement temporal dels diferents aïllats de *P. chlamydosporia* enfrontats o no (controls) amb *Trichoderma* aïllada del sòl M10.55 en medi CMA.

4.3. Identificació de *Trichoderma* mitjançant PCR i validació dels encebadors

Els encebadors utilitzats són específics per a *T. asperellum*, tal i com mostren les Figures 12 i 13: es van cercar les seqüències d'aquests a la base de dades de NCBI i es va obtenir una especificitat del 100% en tots dos casos ("Forward" i "Reverse") per a un gen d'aquesta espècie.

Trichoderma asperellum beta 1,3 exoglucanase mRNA, complete cds

Sequence ID: [EU314718.1](#) Length: 3096 Number of Matches: 1

Range 1: 1946 to 1967 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
44.1 bits(22)	0.018	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

```
Query 1      CACCCTACTACCAGCCAAATCC 22
             |||
Sbjct 1946   CACCCTACTACCAGCCAAATCC 1967
```

Figura 12. BLAST de l'encebador tag83B-F ("Forward"). Font: NCBI.

Trichoderma asperellum beta 1,3 exoglucanase mRNA, complete cds

Sequence ID: [EU314718.1](#) Length: 3096 Number of Matches: 1

Range 1: 2025 to 2044 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	0.29	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus

```
Query 1      CAGAACTGCCGGAACAGGAG 20
             |||
Sbjct 2044   CAGAACTGCCGGAACAGGAG 2025
```

Figura 13. BLAST del "primer" tag83B-R ("Reverse"). Font: NCBI.

Abans d'utilitzar els encebadors tag83-B, es va provar amb els que hi havia disponibles per identificar *Trichoderma*, que eren β -tub Th-F (5'-TTCTTGCATTGGTACTAGCG-3') i β -tub Th-R (5'-ATCGTTCATGTTGGACTCAGCC-3'). Es va fer una PCR amb aquests encebadors i tres soques de *Trichoderma* diferents: una aïllada del sòl M10.55 (Burgués, 2018), T34 (*T. asperellum*) i T22 (*T. harzanium*); però va amplificar per a les tres i, per això vam demanar els encebadors tag83-B, amb els quals es va repetir la PCR i es va aconseguir amplificar només l'aïllat del sòl i T34, discriminant T22 (Figura 14).

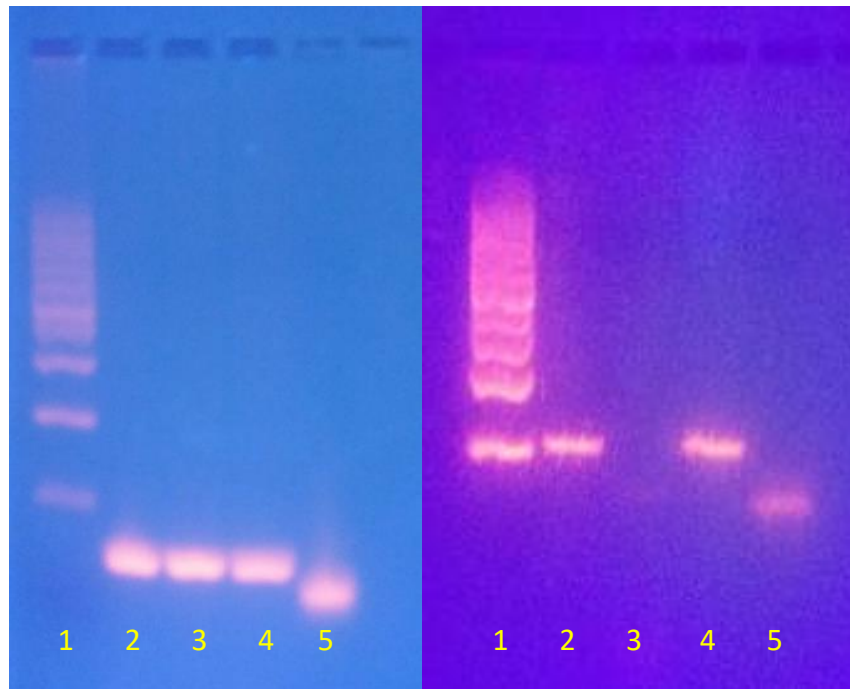


Figura 14. Esquerra: gel d'electroforesi del producte de la PCR amb els primers beta-tub (carrils: 1- marcadors, 2- aïllat del sòl, 3- T34, 4- T22, 5- control negatiu). Dreta: gel de la PCR amb els primers tag83-B (carrils: 1- marcadors, 2- T34, 3- T22, 4- aïllat del sòl, 5- control negatiu).

5. Discussió

En aquest treball de fi de grau, s'ha estudiat l'efecte de l'aplicació de *Trichoderma asperellum* T34 sol (amb un cultivar susceptible a *Meloidogyne*, cv. Durinta) o combinat amb un cultivar de tomàquet resistent a *Meloidogyne* (cv. Monika) sobre la supressivitat del sòl M10.55 a aquests nematodes, demostrada en estudis anteriors (Giné *et al.* 2013; Giné *et al.* 2016).

Tot i que *Trichoderma asperellum* ja és present al sòl M10.55 (Burgués, 2018), l'aplicació de T34 al cultivar resistent redueix significativament la reproducció de *Meloidogyne javanica* respecte al no tractat, cosa que no passa en el cultivar susceptible, com es mostra a la Taula 1. D'aquest fet es pot treure la conclusió que la concentració de *Trichoderma* nativa és massa baixa com per induir resposta a la planta. Amb el mateix raonament, podem afirmar que l'efecte de *Trichoderma* depèn, a la vegada, de la dosi aplicada i de la densitat de nematodes. Així doncs, la dosi aplicada al cultivar susceptible podria ser insuficient per provocar una reducció significativa de la reproducció. Puertas *et al.* (2006) van obtenir resultats semblants en estudiar la interacció de *P. chlamydosporia* amb agents de control biològic, com *Trichoderma harzanium*, en el control de *M. incognita* en tomàquet en torreta, ja que van observar que la reproducció del nematode era similar en tractaments amb *P. chlamydosporia* únicament i combinada amb *T. harzanium*.

Pel que fa al parasitisme fúngic d'ous de *M. javanica*, en estudis previs del sòl M10.55 (Giné *et al.* 2013; Giné *et al.* 2016) es va quantificar un percentatge de parasitisme superior al 50 %, fins arribar al 90 % en algun cas, mentre que en aquest treball no ha superat el 30 % en cap cas, com es mostra a la Taula 1. No obstant, aquests treballs sí que coincideixen en què el principal fong aïllat dels ous va ser *Pochonia chlamydosporia*, responsable de la supressivitat del sòl. Sharon *et al.* (2007) demostren que diferents soques de *Trichoderma* poden parasitar ous i juvenils de segon estadi de *M. javanica* en assajos *in-vitro*, amb valors que arriben al 90% de parasitisme per algunes soques de *T. asperellum*. En aquest treball, s'ha observat que en condicions de semi-camp *Trichoderma* és capaç de parasitar els ous, tot i que només s'ha detectat en un cas.

En el cas de *Trichoderma*, no es pot diferenciar morfològicament si el fong aïllat dels ous de nematode era natiu o bé es corresponia a T34. El fet que només s'hagués trobat en un tractament on es va aplicar T34 feia decantar-nos per la segona opció. A més, l'absència de diferències significatives en el parasitisme fúngic fa que la reducció de la reproducció del nematode en el cultivar resistent per l'aplicació de *T. asperellum* T34 s'hagi d'explicar en base a una resistència sistèmica induïda per aquest fong, com demostra Pocurull (2016) per a tomàquet susceptible cv. Durinta.

Respecte la productivitat, l'aplicació de *T. asperellum* T34 no va comportar cap tipus d'estimulació del creixement, com es mostra a la Taula 1. Altres treballs destaquen que diferents espècies del gènere sí que promouen el creixement (López-Bucio *et al.*, 2015) i el desenvolupament radicular, com ara *T. harzanium* T22 en cultius de blat de moro o soja (Harman, 2000).

En els experiments *in-vitro* en què es va estudiar la interacció de *P. chlamydosporia* i *Trichoderma asperellum* (T34 i nativa del sòl M10.55) es va determinar que el primer no es veia inhibir pels aïllats de *Trichoderma*. El fet que alguns fitopatògens radiculars poguessin inhibir el primer (Monfort, 2004) i que *Trichoderma* spp. sigui capaç de parasitar fongs (López-Bucio *et al.* 2015) ens portava a pensar que *P. chlamydosporia* es podria veure inhibida per *Trichoderma*. Així doncs, es considera que l'aplicació de *T. asperellum* T34 no afecta la microbiota antagònica del sòl supressiu (*P. chlamydosporia*). Malgrat això, aquest fet no és extrapolable a la supressivitat del sòl, tant per les condicions físico-químiques que es donen en aquest com per les interaccions amb la resta de microorganismes presents.

A nivell morfològic, és molt difícil distingir entre espècies del gènere *Trichoderma*, per això fan falta eines de biologia molecular que les permetin identificar a nivell d'espècie. En aquest TFG, es va realitzar una cerca d'encebadors específics per a poder identificar *T. asperellum* (Marcello *et al.* 2010). Es va determinar mitjançant eines de biologia molecular que l'aïllat que es va obtenir d'aquest sòl correspon a l'espècie *T. asperellum*. El resultat de la PCR amb tag83B va validar els encebadors per a identificar T34, a més de identificar l'espècie de *Trichoderma* natiu. Gràcies a això, podem afirmar que aquesta espècie pot parasitar ous de *M. javanica*, ja que, malgrat no poder determinar si *Trichoderma* aïllat d'un ou de nematode és natiu o T34, sabem que ambdós són de la mateixa espècie. En treballs posteriors, es podran utilitzar els encebadors tag83B per identificar fongs paràsits d'ous, per exemple, amb la certesa que es pot identificar *T. asperellum* i, per tant, T34

Així doncs, podem concloure que l'aplicació de la dosi comercial de *Trichoderma asperellum* T34 no afecta la supressivitat del sòl M10.55 ni la seva microbiota i, a més, contribueix a disminuir la reproducció de *M. javanica* en tomàquet resistent cv. Monika mitjançant una resposta vegetal de resistència al nematode, tot i ser capaç de parasitar-ne els ous.

6. Conclusions

Les conclusions d'aquest treball, derivades dels objectius proposats anteriorment, són les següents:

- L'aplicació de la dosi comercial de *Trichoderma asperellum* T34 en un sòl supressiu a *Meloidogyne* redueix la reproducció del nematode en la tomaquera resistent cv. Monika, però no en la susceptible cv. Durinta, sense afectar el parasitisme natural per *Pochonia chlamydosporia*, pel que es podria deure a una activació de mecanismes de defensa de la planta dependent de germoplasma.
- L'aplicació de *Trichoderma asperellum* T34 en un sòl supressiu a *Meloidogyne* no provoca una estimulació de la productivitat vegetal en cap germoplasma de tomàquet.
- En un cultiu *in-vitro* de *Pochonia chlamydosporia* amb *T. asperellum*, no hi ha inhibició destacable en el creixement de cap dels dos fongs a curt termini.
- Les eines de biologia molecular utilitzades permeten identificar *T. asperellum* i, per tant, T34.
- La identificació molecular a nivell d'espècie de l'aïllat de *Trichoderma* del sòl M10.55 correspon a *T. asperellum*.

7. Bibliografia

Adam, M., Westphal, A., Hallmann, J. and Heuer, H. (2014) 'Specific microbial attachment to root knot nematodes in suppressive soil', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), pp. 2679–2686.

Affokpon, A., Coyne, D. L., Htay, C. C., Agbèdè, R. D., Lawouin, L. and Coosemans, J. (2011) 'Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems', *Soil Biology and Biochemistry*, 43, pp. 600–608.

Baker, K. and Cook, R. J. (1974) *Biological control of plant pathogens*. W.H. Freeman and Company. (Libre)

Burgués, L. (2018) *Diversitat de la microbiota de la rizosfera i endofítica d'arrels de tomàquet i cogombre habitant de sòls supressius a Meloidogyne*. (TFG ESAB)

Collange, B., Navarrete, M., Peyre, G., Mateille, T. and Tchamitchian, M. (2011) 'Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis', *Crop Protection*, 30(10), pp. 1251–1262.

Eisenback, J. D. and Triantaphyllou, H. H. (1991) 'Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* species and races', *Manual of Agricultural Nematology*, (November), pp. 281 – 286.

Elhady, A., Giné, A., Topalovic, O., Jacquiod, S., Sørensen, S. J., Sorribas, F. J. and Heue, H. (2017) 'Microbiomes associated with infective stages of root-knot and lesion nematodes in soil', *PLoS ONE*, 12(5), pp. 1–17.

Escudero, N. and Lopez-Llorca, L. V. (2014) 'Estudio de la interacción tritrófica: tomate, *Meloidogyne javanica* y *Pochonia chlamydosporia*', *Boletín informativo. Sociedad Española de Fitopatología*, pp. 73–81.

Giné, A., Bonmatí, M., Sarro, A., Stchiegel, A., Valero, J., Ornat, C., Fernández, C. and Sorribas, F. J. (2013) 'Natural occurrence of fungal egg parasites of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. in organic and integrated vegetable production systems in Spain', *BioControl*, 58(3), pp. 407–416.

Giné, A., Carrasquilla, M., Martínez-Alonso, M., Gaju, N. and Sorribas, F. J. (2016) 'Characterization of Soil Suppressiveness to Root-Knot Nematodes in Organic Horticulture in Plastic Greenhouse', *Frontiers in Plant Science*, 7(February), pp. 1–15.

Goswami, J., Pandey, R. K., Tewari, J. P. and Goswami, B. K. (2008) 'Management of root knot nematode on tomato through application of fungal antagonists, *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*', *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 43(3), pp. 237–240.

Harman, G. E. (2000) 'Myths and Dogmas of Biocontrol. Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22', *Plant Disease*, 84, pp. 377–393.

Hussey, R. S. and Barker, K. R. (1973) 'A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique.', *Plant Disease Reporter*, 75, pp. 1025–1028.

Jenkins, W. R. (1964) 'A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil.', *Plant Disease Reporter*, 48(9).

Llácer, G., Escuer, M. and Pastrana Arancón, M. Á. (1996) *Patología vegetal, Patología vegetal, Vol. 2, 2000, ISBN 84-7114-900-1, págs. 1039-1069*. M.V. Phytoma. (Llibre)

López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R. and Herrera-Estrella, A. (2015) '*Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus', *Scientia Horticulturae*, 196, pp. 109–123.

Lopez-Llorca, L. V, Gómez-Vidal, S., Monfort, E., Larriba, E., Casado-Vela, J., Elortza, F., Jansson, H.-B., Salinas, J. and Martín-Nieto, J. (no date) 'Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization', *FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY*.

Manzanilla-López, R. H., Esteves, I., Finetti-Sialer, M. M., Hirsch, P. R., Ward, E., Devonshire, J. and Hidalgo-Díaz, L. (2013) '*Pochonia chlamydosporia*: Advances and Challenges to Improve Its Performance as a Biological Control Agent of Sedentary Endo-parasitic Nematodes', *Journal of Nematology*, 45(1), pp. 1–7.

Marcello, C. M., Steindorff, A. S., da Silva, S. P., Silva, R. do N., Mendes Bataus, L. A. and Ulhoa, C. J. (2010) 'Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus

- Trichoderma asperellum*', *Microbiological Research*. Urban & Fischer, 165(1), pp. 75–81.
- Monfort, E. (2004) *Interacciones tróficas entre hongos nematófagos, la rizosfera y sus patógenos fúngicos*. Tesis Doctoral per la Universitat d'Alacant.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Zachow, C., Berg, G. and Zeilinger, S. (2012) 'Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control', *Indian Journal of Microbiology*, 52(4), pp. 522–529.
- Onkendi, E. M., Kariuki, G. M., Marais, M. and Moleleki, L. N. (2014) 'The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review', *Plant Pathology*, 63(4), pp. 727–737.
- Perry, R. N., Moens, M. and Starr, J. L. (2009) *Root-Knot Nematodes*. Cambridge, MA : CABI. (Llibre)
- Pocurull , M. (2016) *Capacitat de fongs endòfits d'arrel per induir resposta sistèmica envers Meloidogyne spp. en cultius de solanàcies i cucurbitàcies*. TFG ESAB.
- Puertas, A., De la Noval, B. M., Martínez, B., Miranda, I., Fernández, F. and Hidalgo-Díaz, L. (2006) 'Interacción de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* con *Rhizobium* sp., *Trichoderma harzianum* y *Glomus clarum* en el control de *Meloidogyne incognita*.' , *Revista de Proteccion Vegetal*, 21(2), pp. 80–89.
- Sahebani, N. and Hadavi, N. (2008) 'Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*', *Soil Biology & Biochemistry*, 40(8), pp. 2016–2020.
- Sharon, E., Chet, I., Viterbo, A., Bar-Eyal, M., Nagan, H., Samuels, G. J. and Spiegel, Y. (2007) 'Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix', *European Journal of Plant Pathology*, 118(3), pp. 247–258.
- Sharon, E. and M. Bar-Eyal, I. Chet, A. Herrera-Estrella, O. Kleifeld, and Y. S. (2001) 'Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*', *Phytopathology*, 91, pp. 687–693.
- Siddiqui, Z. A. and Mahmood, I. (1999) 'Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review', *Bioresource Technology*, 69, pp. 167–179.

Siddiqui, Z. A. and Mahmood, I. (1996) 'Biological Control of Plant Parasitic Nematodes By Fungi : a Review', *Bioresource Technology*, 58(1996), pp. 229–239.

Sorribas, F. J., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Galeano, M. and Valero, J. (2005) 'Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes', *European Journal of Plant Pathology*, 111(1), pp. 29–38.

De Waele, D. and Elsen, A. (2007) 'Challenges in Tropical Plant Nematology', *Annual Review of Phytopathology*, 45, pp. 457–485.

Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M. and Thomashow, L. S. (2002) 'Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens', *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), pp. 309–348.

Wesemael, W. M. L., Viaene, N. and Moens, M. (2011) 'Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe', *Nematology*, 13(1), pp. 3–16.

Whitehead, A. G. and Hemming, J. R. (1965) 'A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil', *Annals of Applied Biology*, 55(1), pp. 25–38.