



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona



Capacitat de microorganismes antagonistes de nematodes d'induir resistència envers *Meloidogyne incognita* en cultius hortícoles

Treball final de grau
Enginyeria de Sistemes Biològics

Autora

Inés Fernández Moyano

Tutor acadèmic

Xavier Sorribas Royo

Segona tutora

Aïda Magdalena Fullana

Castelldefels, 2021

Resum

Els nematodes fitoparàsits del gènere *Meloidogyne* (root-knot nematodes – RKN) són paràsits obligats de plantes, en les que produeixen agalles en les arrels, provocant simptomatologia no específica en la part aèria de la planta que va des d'un creixement retardat o irregular fins el marcimement, manca o deficiència de nutrients essencials, disminució en el rendiment del cultiu i fins i tot la mort de la planta hoste. *Meloidogyne* està àmpliament distribuït arreu del món i causa elevades pèrdues de producció en un ampli rang de cultius, inclosos els cultius hortícoles. La creixent demanda, per part de la població, dels productes generats al sector hortícol, alerta de la necessitat d'augmentar el rendiment d'aquests cultius en un entorn on cal prioritzar les tècniques respectuoses amb el medi ambient i amb la salut dels usuaris i consumidors. Així doncs, la gestió del nematode mitjançant tècniques basades en l'ús d'organismes antagonistes que actuïn directament sobre el patògen o que actuïn indirectament induint mecanismes de defensa de la planta pot ésser una bona alternativa als fumigants o nematicides d'origen químic.

En el present estudi, es va avaluar la capacitat de tres formulats comercials a base de microorganismes antagonistes de nematodes, concretament a base dels fongs *Purpureocillium lilacinum* soca 251 (PL) i *Trichoderma asperellum* soca T34 (T34), i del bacteri *Bacillus firmus* soca I-1582 (BF), d'induir resistència enfront *Meloidogyne incognita* en tomàquet, pebrot, meló i síndria, quatre dels principals cultius hortícoles que es conreen al nostre país. Els assajos es van fer en condicions controlades. Les llavors es van desinfectar superficialment i es van sembrar en safates que contenien vermiculita estèril i es van mantenir en cambra climàtica a 25 °C de temperatura i 16:8 h de fotoperíode (llum:foscor). Les plantes es van trasplantar en contenidors de 200 cm³ de capacitat que contenien sorra esterilitzada com a substrat quan tenien la segona fulla veritable estesa, i al cap d'una setmana es van aplicar 20 mL de suspensió de 10⁹ UFC de BF, 7,5·10⁵ UFC de PL i 2·10⁶ UFC de T34 a la sorra i es van mantenir en cambra climàtica a les mateixes condicions. Al cap d'una setmana, el sòl es va infestar amb 200 juvenils de *M. incognita* per planta. Els assajos van mantenir-se el temps suficient per a que el nematode completés una generació. Al final de l'assaig es va determinar l'efecte dels diferents microorganismes sobre la infectivitat, reproducció i fertilitat del nematode en cada cultiu, comparant les diferents variables entre plantes tractades i no tractades amb els microorganismes.

Els resultats van mostrar que la capacitat dels microorganismes d'induir resistència envers *M. incognita* era dependent del tipus de cultiu. L'aplicació de BF va reduir la infecció, reproducció i fertilitat de *M. incognita* en un 81%, 87% i 32%, respectivament, en el cultiu de tomàquet, així com la fertilitat en meló en un 32%. El cultiu de síndria va mostrar una baixa tolerància a BF provocant la mort del 80% de les plantes. L'aplicació de T34 va reduir en un 38% el nombre de masses formades per *M. incognita* en el cultiu de meló. L'aplicació de PL no va tenir cap efecte sobre la capacitat infectiva, reproductora, ni sobre la fertilitat de les femelles en cap cultiu.

Paraules clau: *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus firmus*, nematode agallador, pebrot, tomàquet, meló i síndria.

Resumen

Los nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne* (root-knot nematodos - RKN) son parásitos obligados de plantas, en las que producen agallas en las raíces, provocando sintomatología no específica en la parte aérea de la planta que va desde un crecimiento retardado o irregular hasta el marchitamiento, falta o deficiencia de nutrientes esenciales, disminución en el rendimiento del cultivo e incluso la muerte de la planta huésped. *Meloidogyne* está ampliamente distribuido en todo el mundo y causa elevadas pérdidas de producción en un amplio rango de cultivos, incluidos los cultivos hortícolas. La creciente demanda, por parte de la población, de los productos generados en el sector hortícola, alerta de la necesidad de aumentar el rendimiento de estos cultivos en un entorno donde hay que priorizar las técnicas respetuosas con el medio ambiente y con la salud de los usuarios y consumidores. Así pues, la gestión del nematodo mediante técnicas basadas en el uso de organismos antagonistas que actúen directamente sobre el patógeno o que actúen indirectamente induciendo mecanismos de defensa de la planta puede ser una buena alternativa a los fumigantes o nematicidas de origen químico.

En el presente estudio, se valora la capacidad de tres formulados comerciales a base de microorganismos antagonistas de nematodos, concretamente a base de los hongos *Purpureocillium lilacinum* cepa 251 y *Trichoderma asperellum* cepa T34, y la bacteria *Bacillus firmus* cepa I-1582, de inducir resistencia frente *Meloidogyne incognita* en tomate, pimiento, melón y sandía, cuatro de los principales cultivos hortícolas que se cultivan en nuestro país. Los ensayos se hicieron en condiciones controladas. Las semillas se desinfectaron superficialmente y se sembraron en bandejas que contenían vermiculita estéril y se mantuvieron en cámara climática a 25 °C de temperatura y 16:8 h de fotoperiodo (luz: oscuridad). Las plantas se trasplantaron en contenedores de 200 cm³ de capacidad que contenían arena esterilizada como sustrato cuando tenían la segunda hoja verdadera extendida y al cabo de una semana se aplicaron 20 mL de suspensión de 10⁹ UFC de BF, 7, 5 · 10⁵ UFC de PL y 2 · 10⁶ UFC de T34 en la arena y se mantuvieron en cámara climática en las mismas condiciones. Al cabo de una semana, el suelo se infestó con 200 juveniles de *M. incognita* por planta. Los ensayos se mantuvieron el tiempo suficiente para que el nematodo completara una generación. Al final del ensayo se determinó el efecto de los diferentes microorganismos sobre la infectividad, reproducción y fertilidad del nematodo en cada cultivo, comparando las diferentes variables entre plantas tratadas y no tratadas con los microorganismos.

Los resultados mostraron que la capacidad de los microorganismos de inducir resistencia hacia *M. incognita* era dependiente del tipo de cultivo. La aplicación de BF redujo la infección, reproducción y fertilidad de *M. incognita* en un 81%, 87% y 32%, respectivamente, en el cultivo de tomate, así como la fertilidad en melón en un 32%. El cultivo de sandía mostró una baja tolerancia a BF provocando la muerte del 80% de las plantas. La aplicación de T34 redujo en un 38% el número de masas formadas por *M. incognita* en el cultivo de melón. La aplicación de PL no tuvo ningún efecto sobre la capacidad infectiva, reproductora, ni sobre la fertilidad de las hembras en ningún cultivo.

Palabras clave: *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus firmus*, nematodo agallador, pimiento, tomate, melón y sandía.

Abstract

The plant-parasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes - RKN) are obligate parasites of plants, in which they produced galls in the roots, causing nonspecific symptomatology in the aerial part of the plant that goes from a delayed or irregular growth to wilting, lack or deficiency of essential nutrients, decrease in crop yield and even death of the host plant. *Meloidogyne* is widely distributed around the world and causes high production losses in a wide range of crops, including horticultural crops. The growing demand of the population for the products generated in the horticultural sector makes it necessary to increase the yields of these crops, but through environmentally and health friendly techniques. Thus, the management of plant-parasitic nematodes by means of antagonistic organisms that act directly on the pathogen or that act indirectly by inducing plant defense mechanisms can be a good alternative to chemical fumigants or nematicides.

The present study evaluated the ability of three commercial formulations based on nematode antagonist microorganisms, specifically based on the fungi *Purpureocillium lilacinum* strain 251 and *Trichoderma asperellum* strain T34 and the bacterium *Bacillus firmus* strain I-1582, to induce resistance against *Meloidogyne incognita* in tomato, pepper, melon and watermelon, four of the main horticultural crops that cultivate in our country. The trials were conducted under controlled conditions. The seeds were superficially disinfected and sown in trays containing sterile vermiculite and kept in a climatic chamber at 25 °C temperature and 16:8 h photoperiod (light: dark). The plants were transplanted in containers of 200 cm³ capacity containing sterilized sand as a substrate when they had the second true leaf spread and after one week 20 mL of suspension of 10⁹ CFU of BF, 7, 5 · 10⁵ CFU of PL and 2 · 10⁶ CFU of T34 was applied in the sand and were kept in climatic chamber under the same conditions. One week later, the soil became infested with 200 juveniles of *M. incognita* per plant. The trials lasted long enough for the nematode to complete a generation. At the end of the trial, the effect of different microorganisms on the infectivity, reproduction and fertility of the nematode in each culture was determined by comparing the different variables between treated and untreated plants with the microorganisms.

The results showed that the ability of microorganisms to induce resistance to *M. incognita* was dependent on the type of culture. Application of BF reduced *M. incognita* infection, reproduction and fertility by 81%, 87% and 32%, respectively, in tomato cultivation, as well as fertility in melon by 32%. Watermelon crop showed a low tolerance to BF causing the death of 80% of plants. Application of T34 reduced the number of masses formed by *M. incognita* by 38% in melon cultivation. Application of PL had no effect on infectious, reproductive capacity, or on fertility of females in any crop.

Keywords: *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus firmus*, root-knot nematodes, pepper, tomato, melon and watermelon.

Sumari

ÍNDEX DE FIGURES	8
ÍNDEX DE TAULES	9
SÍMBOLS I ACRÒNIMS	10
AGRAÏMENTS	11
1. INTRODUCCIÓ	12
1.1. Importància dels cultius hortícoles	12
1.2. <i>Meloidogyne spp</i>	15
1.2.1. Cicle de vida	16
1.2.2. Efecte sobre els cultius hortícoles.....	18
1.3. Gestió de <i>Meloidogyne spp.</i> mitjançant agents de control biològics.....	19
1.3.1. <i>Bacillus firmus</i> soca I-1582	20
1.3.2. <i>Purpureocillium lilacinum</i> soca 251	21
1.3.3. <i>Trichoderma asperellum</i> soca T34.....	22
2. OBJECTIUS	24
3. MATERIALS I MÈTODES	25
3.1. Material vegetal, productes comercials a base de microorganismes i nematode	25
3.2. Assajos	25
3.2.1. Sembrar, germinació i trasplantament	26
3.2.2. Tractament amb els formulats comercials a base de microorganismes.....	27
3.2.3. Extracció de DNA i detecció dels microorganismes mitjançant PCR.....	27
3.2.4. Inoculació del nematode.....	29
3.2.5. Anàlisis estadístiques	31
4. RESULTATS	32
5. DISCUSSIÓ	37
CONCLUSIONS	41
BIBLIOGRAFIA	42
Referències bibliogràfiques	42
ANNEXOS	50
Annex A: Concentració de l'inòcul i la seva viabilitat	50
Annex B: Resultats del pes, recompte de masses i ous i determinació de la fertilitat.	52

Índex de figures

Figura 1. Distribució de la producció de fruites i hortalisses. A: Mundial (FAOSTAT, 2016). B: Europea (EUROSTAT, 2017).	12
Figura 2. Producció mitjana de tomàquets (frescs); xilis, pebrots picants i pebrots (verds); melons (inclosos cantalupe) i síndries, a Espanya des de l'any 1994 al 2019 (FAOSTAT, 2019).	13
Figura 3. Evolució temporal del rendiment dels cultius de tomàquets (frescs); xilis, pebrots picants i pebrots (verds); melons (inclosos cantalupe) i síndries a Espanya (FAOSTAT, 2019).	15
Figura 4. Morfologia dels nematodes formadors de nòduls (<i>Meloidogyne</i> spp). A: ous i juvenils; B: femella adulta piriforme; C: regió anterior de la femella on es pot veure l'estilet (es); D: regió anterior de la femella que mostra el porus excretor (pe); E, F: regions anterior i posterior del juvenil infectiu (J2); G: regió caudal del mascle (Castillo i Verdejo-Lucas, 2011).	16
Figura 5. Cicle vital dels nematodes del gènere <i>Meloidogyne</i> (Mitkowski i Abawi, 2003).	17
Figura 6. Agalles formades en una planta de tomàquet cv. Durinta infestada per <i>M. incognita</i> procedent d'un experiment de l'hivernacle d'Agropolis ubicat a Viladecans (Font pròpia).	18
Figura 7. Esquema de les fases a seguir per dur a terme l'experiment.	25
Figura 8. Plantes de pebrot cv. Tinsena just després de trasplantar (Font pròpia).	26
Figura 9. Arrels de tomàquet cv. Durinta sense tractar on es poden visualitzar les masses d'ous tenyides amb erioglaucina (Font pròpia).	30
Figura 10. Gel d'electroforesi al 2% d'agarosa carregat amb 10µL de producte de PCR. M: marcador de pes molecular conegut; T34: DNAg de <i>Trichoderma asperellum</i> soca T34 amplificat amb els encebadors específics; T34 (-) control negatiu de la PCR de T34; BF: <i>Bacillus firmus</i> soca I-1582 amplificat amb els encebadors específics; BF (-) control negatiu de la PCR de BF; PL: <i>Purpureocillium lilacinum</i> soca 251 amplificat amb els encebadors específics; PL (-) control negatiu de la PCR de PL.	33
Figura 11. Arrels de pebrot cv. Tinsena, tomàquet cv. Durinta, síndria cv. Sugar baby i meló cv. Charentais sense tractar i tractades amb T34, PL i BF cop finalitzat l'experiment (Font pròpia).	35

Índex de taules

Taula 1. Encebadors utilitzats per a la PCR. _____	28
Taula 2. Quantificació de T34, PL i BF en NanoDrop on ng/mL indica la concentració en què es troba cada microorganisme i 260/280 la presència d'RNA i la qualitat del material. _____	32
Taula 3. Pes d'arrel, infectivitat, reproducció i fertilitat del nematode en els cultivars susceptibles de pebrot (Tinsena), tomàquet (Durinta), síndria (Sugar baby) i meló (Charentais) no tractats (Control) o tractats amb T34 Biocontrol (T34), BioAct (PL) o Votivo (BF) una setmana després de trasplantar el cultiu en contenidors de 200 cm ³ de capacitat, i inoculats una setmana després amb 200 J2 de <i>M. incognita</i> per planta i mantinguts en cambra climàtica fins que el nematode completés una generació. _____	34
Taula 4. Eficiència de cada microorganisme a les 48h i 72h després de la sembra. _____	51
Taula 5. Resultats obtinguts en pebrot cv. Tinsena. _____	52
Taula 6. Resultats obtinguts en tomàquet cv. Durinta. _____	54
Taula 7. Resultats obtinguts en Síndria cv. Sugar Baby. _____	56
Taula 8. Resultats obtinguts en meló cv. Charentais. _____	57

Símbols i acrònims

BF	<i>Bacillus firmus</i> soca I-1582
ISR	Resistència Sistèmica Induïda
J1	Juvenils de primer estadi
J2	Juvenils de segon estadi
J3	Juvenils de tercer estadi
J4	Juvenils de quart estadi
PCA	Plate Count Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
PL	<i>Purpureocillium lilacinum</i> soca 251
RE	Reglament d'execució
RKN	Root-knot nematodes (Nematodes de nus d'arrel)
S	Constant tèrmica
T34	<i>Trichoderma asperellum</i> soca T34
Tb	Temperatura basal
Tm	Temperatura mitjana
UFC	Unitats formadores de colònies

Agraïments

En aquest treball de final de grau he pogut comptar amb el suport de diverses persones, tant de forma professional com personal, sense les quals tot el procés no hauria estat el mateix, pel que m'agradaria valorar la seva gran aportació.

En primer lloc volia agrair al meu tutor, el Dr. Xavier Sorribas, que sense conèixer-me de res em va donar la oportunitat, quan més la necessitava, de participar en aquest projecte i ajudar-me a adquirir nous coneixements sobre la temàtica en què treballa, dirigint de manera excel·lent tot el desenvolupament de l'experiment.

Per suposat, donar les gràcies a la meva segona tutora Aïda Magdalena Fullana per acollir-me al laboratori com una més del grup, guiar-me en el meu aprenentatge, supervisant i corregint-me per que aprengui de les petites errades, sempre amb una amabilitat i unes ganes encomiables amb que m'ha transmès un interès i motivació per la ciència major del que tenia. També al Dr. Alex Expósito, per ajudar-me quan he tingut algun dubte i a la Dra. Nuria Escudero, per posar-me en contacte amb aquest gran equip de professionals.

Agrair també als meus familiars per animar-me sempre a formar-me, a aprofitar tota oportunitat que se'm presenta i per suportar el meus daltabaixos deguts a l'estrès del procés. En especial a la meva àvia per ensenyar-me la constància i l'esforç que s'ha de posar en allò que es fa per aconseguir un objectiu i a la meva germana per alguna que altra ajuda en l'edició d'imatges i per treure'm pressió de sobre amb el seu positivisme. No oblidar-me tampoc dels meus amics, per estar de forma incondicional i donar-me tota la força per aconseguir finalitzar aquesta etapa i per esser els millors regals que m'ha pogut aportar la vida.

Per últim, al meu company de vida, per reconfortar-me en els moments més durs i donar-me ales per perseguir els meus somnis. Gràcies per les nits de paciència, per deixar-me l'espai que necessitava per concentrar-me i inspirar-me confiança en el meu treball.

Gràcies a tots per fer-ho possible!



1. Introducció

1.1. Importància dels cultius hortícoles

L'horticultura, tal com la seva etimologia indica, és una tècnica de cultiu de plantes en horts. És la forma de subsistència més emprada des de l'antiguitat ja que aporta béns essencials per a l'alimentació humana degut als components nutricionals i de defensa dels seus productes, que contenen vitamines, minerals, i altres substàncies beneficioses per la salut (**Horticultura, 2018**). Degut a la creixent demanda, aquest tipus de cultius han hagut d'evolucionar per millorar la qualitat i rendiment dels seus productes.

Aquest sector, té una gran importància econòmica, tant de manera directa, pels beneficis obtinguts a partir de la seva producció, que l'any 2017 van superar els 14.000 milions d'euros a Espanya, com indirectament, per la ocupació que genera en el sector agrari i els àmbits relacionats (**MAPA, 2018**).

A nivell mundial, Espanya és el sisè productor de fruites i hortalisses (2% de la producció mundial), i el primer de la Unió Europea amb un 25% de la producció total en tones (*Figura 1*).

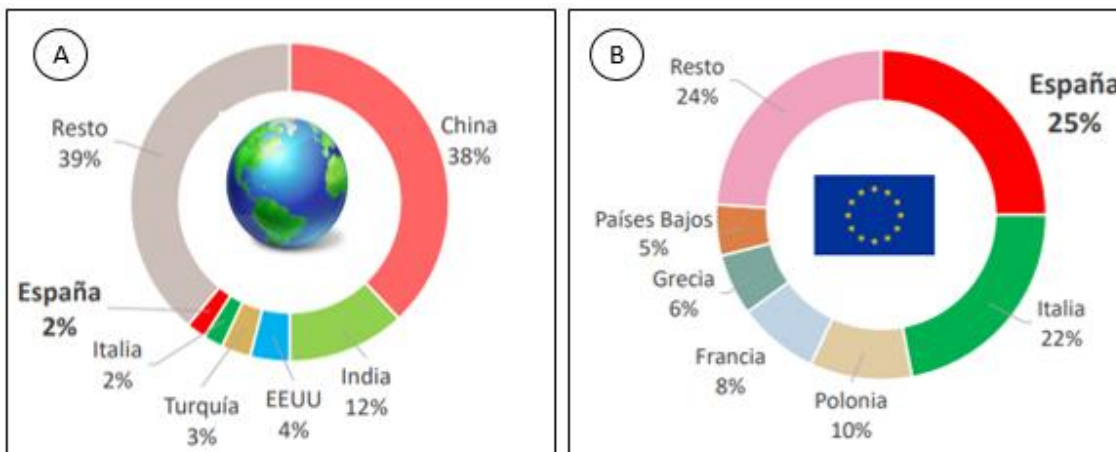


Figura 1. Distribució de la producció de fruites i hortalisses. A: Mundial (**FAOSTAT, 2016**). B: Europea (**EUROSTAT, 2017**).

Alguns dels cultius hortícoles més destacats són el tomàquet (*Solanum lycopersicum*), el pebrot (*Capsicum annuum*), el meló (*Cucumis melo*) i la síndria (*Citrullus lanatus*) ja que es produeixen en

elevades quantitats i es troben entre els cultius amb rendiments majors, sobretot en hivernacles. L'any 2019 a Espanya van tenir una producció de 5; 1,4; 0,66 i 1,2 milions de tones, respectivament (Figura 2), contribuint quantiosament a l'economia del país (FAOSTAT, 2019).

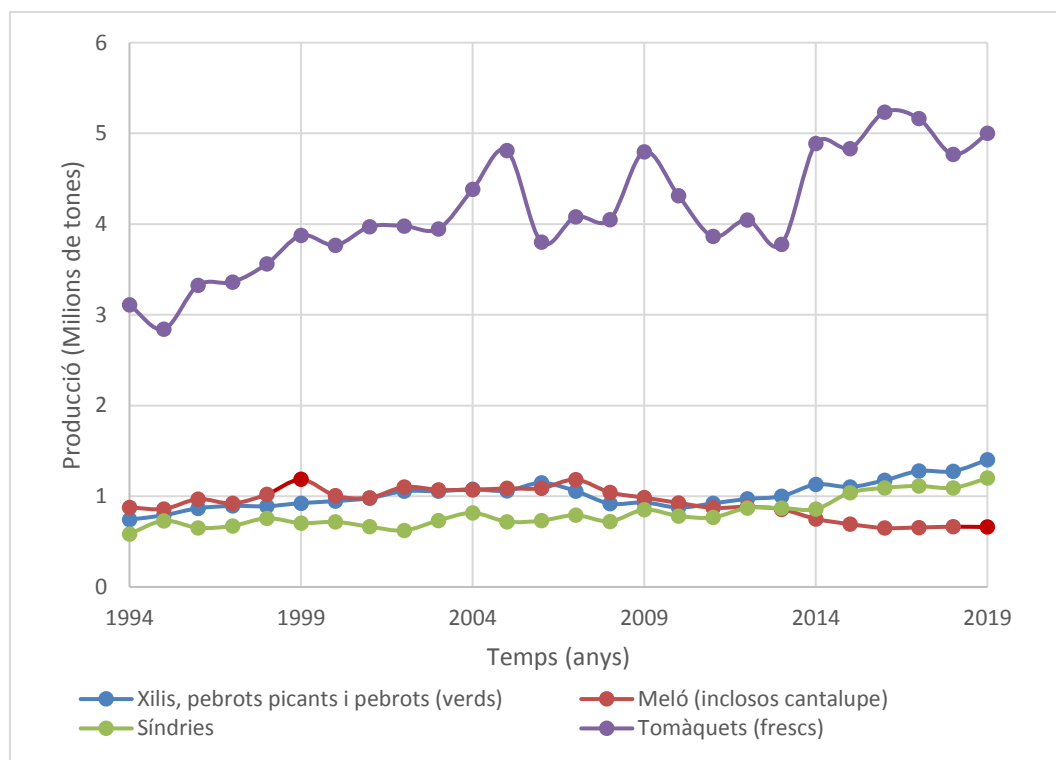


Figura 2. Producció mitjana de tomàquets (frescs); xilis, pebrots picants i pebrots (verds); melons (inclosos cantalupe) i síndries, a Espanya des de l'any 1994 al 2019 (FAOSTAT, 2019).

El tomàquet és una planta originària d'Amèrica del Sud, pertanyent a la família de solanàcies. És una de les hortalisses de major importància, tant pel seu valor econòmic com pel seu contingut en vitamines i minerals (Larín et al., 2018). Concretament és, després de la patata, l'hortalissa més important, representant el 30% de la producció hortícola del món (Argerich i Gaviola, 2011). La producció espanyola d'aquest cultiu (5 milions de tones) representa un 2,77% del total mundial (180 milions de tones) (FAOSTAT, 2019).

El pebrot és una solanàcia d'origen Sud-Americà, i un del cultius hortícoles amb major superfície cultivada a Espanya (MAPA, 2018), essent el màxim productor europeu i el sisè del món (Díaz, 2019), produint un 3,68% de les tones totals (FAOSTAT, 2019).

El meló és una planta de la família de les cucurbitàcies cultivada pel seu fruit comestible. El seu origen és confús, ja que s'han trobat evidències de la seva existència tant al continent asiàtic com a l'africà. No obstant, la gran ocurrència d'espècies silvestres a l'Àfrica fa que la majoria d'autors es decantin per aquesta regió com a centre de la seva procedència (**Zamora-Gómez i Loredó-Treviño, 2020**). És la tercera cucurbitàcia més important del món, el que fa que hi hagi una gran superfície destinada a la seva sembra, tot i que es distribueix més freqüentment en climes tropicals i secs (**CONABIO i SIOVM, s.d.**). La primera potència mundial en producció de meló és la Xina amb un 48% (12,2 milions tones) seguida d'altres països entre els quals es troba Espanya en cinquè lloc amb un 4% (1 milió de tones). Tot i la seva inferior producció, Espanya és el país amb majors rendiments (32,2 tones/ha) (**FAOSTAT, 2009**).

La síndria pertany a la família de les cucurbitàcies, i destaca principalment per l'elevat contingut en aigua i el dolç sabor del seu fruit (**González, 2017**). Es considera d'origen africà, però a Àsia es concentra més del 80% de la producció mundial, essent la Xina el principal productor (**Humphrey, 2017**). Espanya ocupa la posició catorze pel que fa a tones de síndries produïdes, però obté rendiments de 56 t/ha, molt per sobre dels aconseguits pels principals productors (**FAOSTAT, 2019**).

El rendiment d'aquests cultius ha anat en augment els últims anys (*Figura 3*) (**FAOSTAT, 2019**). Aquesta evolució és resultat dels avenços tecnològics (mecanització de les tasques agrícoles, introducció de fertilitzants i productes de sanitat vegetal, digitalització amb sensors que controlen les condicions dels cultius, etc.) i biològics (principalment ús de varietats híbrides que presenten resistència a certes plagues i malalties) (**PwC, 2019**).

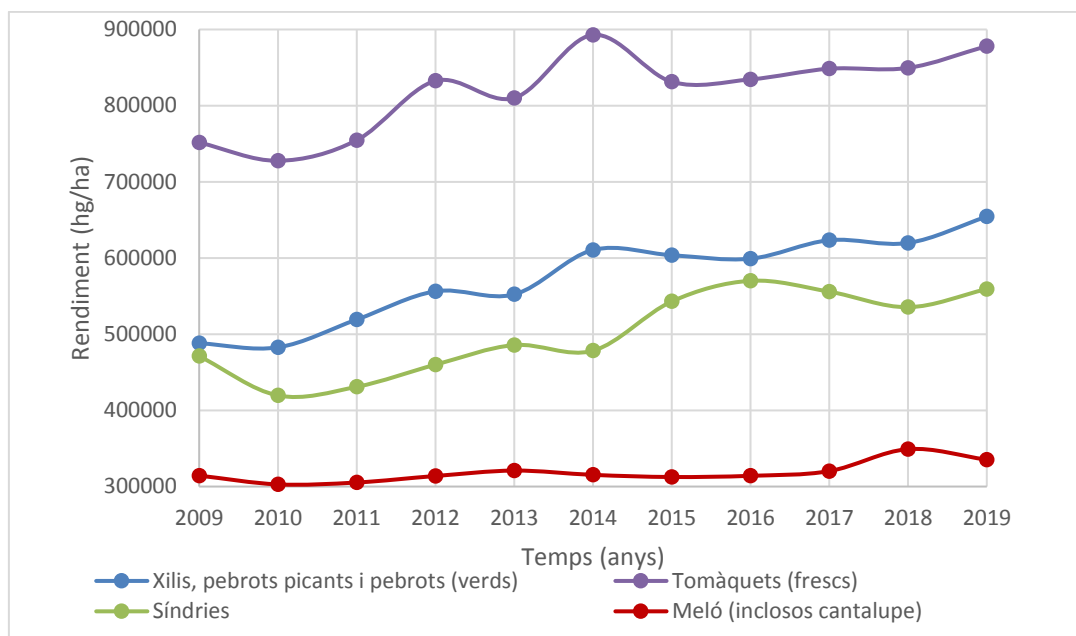


Figura 3. Evolució temporal del rendiment dels cultius de tomàquets (frescs); xilis, pebrots picants i pebrots (verds); melons (inclosos cantalupe) i síndries a Espanya (FAOSTAT, 2019).

Tot i això, els rendiments poden veure's afectats per diversos agents biòtics, inclosos els nematodes fitoparàsits.

1.2. *Meloidogyne spp*

Meloidogyne és el principal nematode fitoparàsit que afecta la producció de conreus tant herbacis com llenyosos (Jones et al., 2013). De les més de 100 espècies descrites fins l'actualitat, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* i *M. hapla* són les més àmpliament distribuïdes arreu del món i les responsables de la majoria de pèrdues de producció causades pels nematodes d'aquest gènere (Ornat i Sorribas, 2008). Les espècies de *Meloidogyne* són nematodes endoparàsits sedentaris que formen agalles en les arrels de les plantes que parasiten (root-knot nematodes - RKN). Es qualifiquen com endoparàsits degut a que el seu cicle biològic es duu a terme total o parcialment dins de la planta hoste. Per altra banda, el terme sedentari, fa referència a la seva forma d'alimentar-se que consisteix en induir la modificació de les cèl·lules vegetals per establir una font

continua d'aliment a la que romanen units fins acabar el seu cicle vital (**Castillo i Verdejo-Lucas, 2011**). A la *Figura 4*, podem observar la morfologia dels nematodes d'aquest gènere.

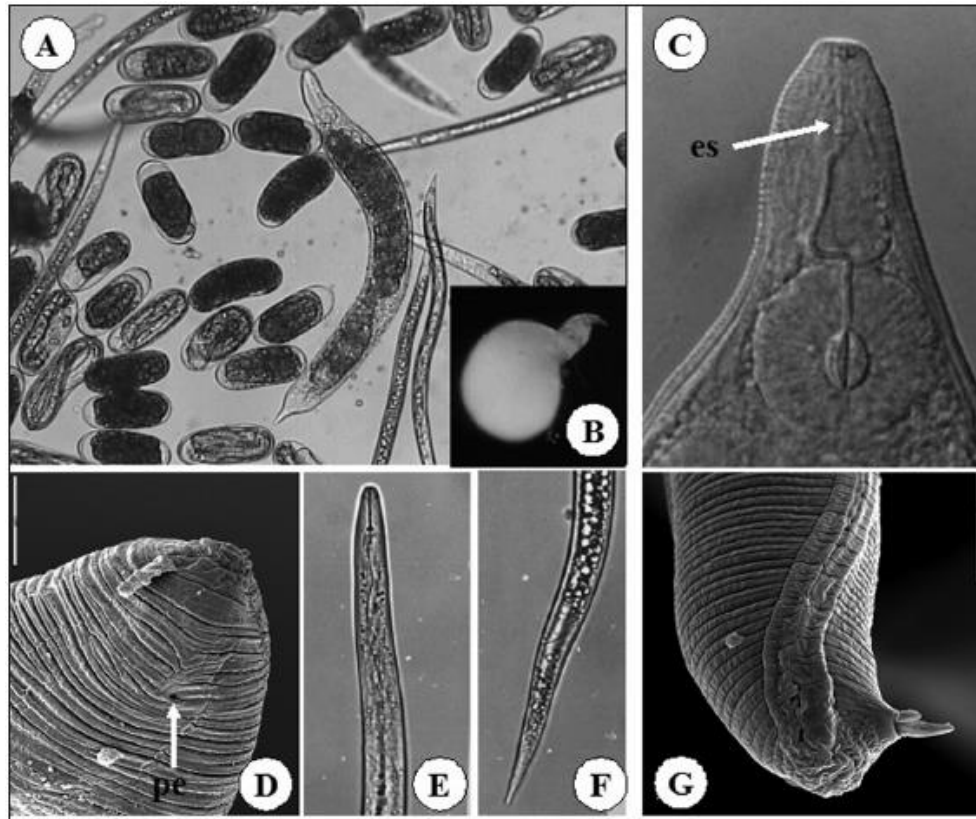


Figura 4. Morfologia dels nematodes formadors de nòduls (*Meloidogyne* spp). A: ous i juvenils; B: femella adulta piriforme; C: regió anterior de la femella on es pot veure l'estilet (es); D: regió anterior de la femella que mostra el porus excretor (pe); E, F: regions anterior i posterior del juvenil infectiu (J2); G: regió caudal del mascle (**Castillo i Verdejo-Lucas, 2011**) .

1.2.1. Cicle de vida

El seu cicle vital consta de sis estadis de desenvolupament: ou, quatre estadis juvenils (J1-J4) i l'estadi adult (*Figura 5*) . Els ous es troben agregats en una matriu gelatinosa (massa d'ous) que els protegeix enfront a condicions adverses. El desenvolupament embrionari dona lloc al juvenil de primer estadi (J1) que mudarà dins l'ou donant lloc al J2. El J2 emergirà de l'ou, i serà l'únic estadi juvenil que es troba lliure al sòl i cercarà una arrel per parasitar. El J2 penetra l'arrel prop de la zona d'elongació mitjançant l'acció mecànica de l'estilet i l'acció dels enzims segregats pel nematode per

dissoldre el ciment intercel·lular, i migra fins arribar al cilindre vascular (Castillo i Verdejo-Lucas, 2011). Un cop allà, establirà un lloc d'alimentació, induint canvis morfològics i fisiològics en les cèl·lules que envolten el cap, convertint-les en cèl·lules gegants i multinucleades amb una elevada taxa metabòlica que permeten l'alimentació del nematode durant la resta de la seva vida. Les modificacions que causen en els teixits donen lloc als nòduls o agalles que són característics de les plantes parasitades per aquest gènere. Un cop establerta la infecció, el J2 pren forma de salsitxa i esdevé sedentari, a cada muda (J3 i J4), la llargària i amplada del juvenil incrementa abans de diferenciar-se en femella o mascle adults. En condicions òptimes per al desenvolupament de la població, arriba a l'estadi de femella adulta, i comença a produir la matriu gelatinosa on s'aniran acumulant els ous a mida que els vagi produint, tancant així el cicle. Si les condicions són adverses, el juvenil esdevé mascle, que és vermiforme i viurà lliure en el sòl sense alimentar-se, reduint així la competència intraespecífica. La durada del cicle de vida depèn principalment de la temperatura del sòl, ja que es tracta d'un organisme poiquiloterm, i de la planta hoste (Ornat i Sorribas, 2008).

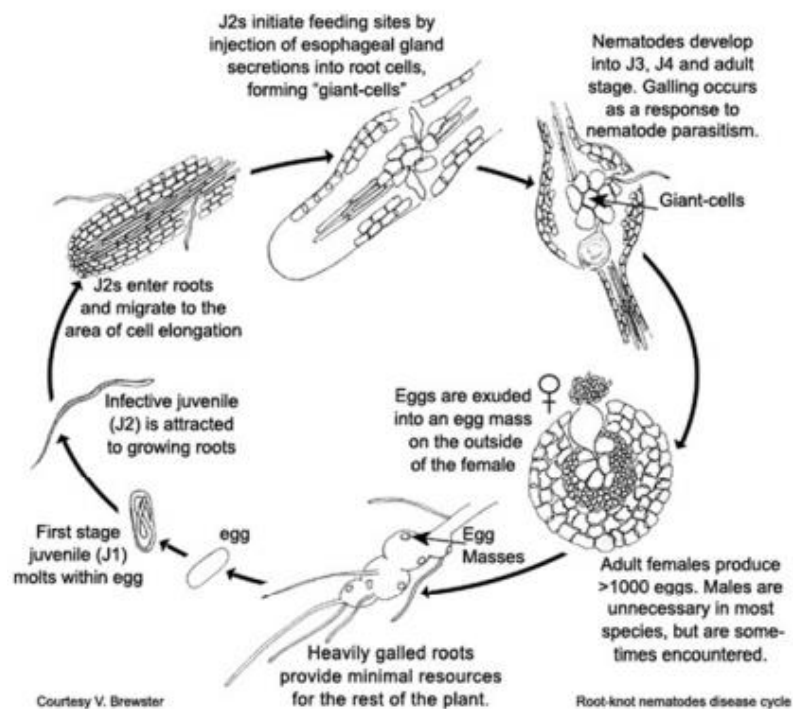


Figura 5. Cicle vital dels nematodes del gènere *Meloidogyne* (Mitkowski i Abawi, 2003).

1.2.2. Efecte sobre els cultius hortícoles

A conseqüència de la infecció per *Meloidogyne spp.*, la part aèria de les plantes afectades poden mostrar símptomes de marcimement degut a la dificultat de les arrels per absorbir l'aigua i els nutrients essencials pel seu creixement, cosa que fa que també puguin presentar signes de manca o deficiència de nutrients, com la clorosis. A més, el creixement es veu retardat, el rendiment del cultiu disminueix considerablement i, si la densitat de població és molt elevada, la planta hoste pot arribar a morir. No obstant, aquesta simptomatologia no és específica dels nematodes, sinó que pot estar causada per altres factors biòtics o abiòtics. El símptoma característic de l'atac de *Meloidogyne* es localitza a les arrels, on s'aprecien les agalles o nòduls (*Figura 6*).

Les pèrdues màximes de producció varien en funció del cultiu, les densitats de població del nematode en el moment del transplantament i el número de cicles que el nematode pugui completar durant el cultiu. Les pèrdues màximes de producció causades per *Meloidogyne* en tomàquet, pebrot, meló i síndria a la conca mediterrània varien entre el 37% i el 90% (**Greco i Di Vito, 2009; López-Gómez et al., 2014; Giné i Sorribas, 2017; Expósito et al., 2020**).



Figura 6. Agalles formades en una planta de tomàquet cv. Durinta infestada per *M. incognita* procedent d'un experiment de l'hivernacle d'Agropolis ubicat a Viladecans (**Font pròpia**).

1.3. Gestió de *Meloidogyne spp.* mitjançant agents de control biològics

Per tal de disminuir la densitat de nematodes per sota del llindar de tolerància en les plantacions, límit a partir del qual el cultiu comença a experimentar pèrdues de producció, s'han establert diversos tipus d'estratègies. La complexitat de la gestió d'aquests organismes ve donada pel genotip, per la variabilitat de poblacions segons el tipus de sòl, i per les característiques d'aquest sòls com la temperatura, humitat i composició, entre d'altres (**Ravichandra, 2014**).

La seva gestió es pot dur a terme de manera: preventiva, emprant material vegetal lliure de nematodes i sòls verges; reduint el nivell de població inicial abans de plantació amb tècniques com la biofumigació, la solarització, el cultiu trampa, l'ús de nematicides químics, el descans i treball del sòl, entre d'altres; o reduint la taxa de multiplicació amb resistència vegetal, rotació de cultius, o mitjançant agents de control biològics (**Talavera i Verdejo-Lucas, 2015**). Tot i la diversitat de mètodes existents per dur a terme una bona gestió dels nematodes fitoparàsits, cadascun presenta uns determinats avantatges i limitacions.

La solarització, per exemple, pot ser altament eficaç enfront els nematodes quan es realitza un mínim de 4 setmanes en l'època de major radiació solar, adquirint el sòl temperatures d'entre els 35 °C i els 50 °C fins uns 30 cm de profunditat, no obstant, no és un mètode selectiu i pot reduir components del sòl que afectin a organismes antagonistes de certs patògens de plantes (inclosos els nematodes). El control químic, té una elevada i ràpida eficàcia, però el seu ús s'ha vist molt restringit en els últims anys, en què s'han prohibit la gran majoria (per exemple el bromur de metil i el 1,3-dicloropropè) degut a les exigències legislatives actuals (**Giné et al. 2020**) derivades de l'elevat risc potencial de contaminació ambiental que suposen i la toxicitat que poden generar als productors i consumidors (**Andrés, 2002**). L'ús de varietats resistents limita la capacitat infectiva i/o reproductiva dels nematodes sense afectar a la producció dels cultius de forma significativa i és un mètode efectiu, econòmic i de baix impacte ambiental, però pot generar l'aparició de poblacions virulentes si se'n fa un ús reiterat. Espaiar el temps entre cultius susceptibles mitjançant la rotació de cultius també podria disminuir suficientment les poblacions de nematodes obtenint bons resultats en el control però l'efectivitat és molt dependent de la gamma d'hostes sobre la que pot actuar el nematode (**Ornat i Sorribas, 2011**). El control biològic consisteix en fer ús de fongs, bacteris

o altres organismes, que són antagonistes d'un determinat paràsit que suposa danys en una plantació per tal de reduir-lo o eliminar-lo. Les soques de l'agent emprat han de tenir la capacitat d'entrar en contacte amb la planta sense produir danys o símptomes de malaltia (**Rubio i Fereres, 2005**). Amb aquests, es regulen les poblacions de nematodes de manera directa per l'acció antagònica dels organismes, indirecta pels metabòlits produïts per aquests, interferint en el procés de reconeixement de l'hoste o mitjançant la inducció de mecanismes de resistència en la planta (**Ornat i Sorribas, 2011**) ja que la majoria d'aquests agents estan composts per productes o substàncies capaces d'activar el sistema immunològic (priming) requerint un elevat coneixement, una manipulació delicada i podent necessitar més temps per obtenir resultats visibles (**Artal, 2019**). Tot i això, el control biològic té un impacte ambiental molt inferior a altres tècniques i, a més, evita l'aparició de resistències. No obstant, l'eficàcia és escassa quan les densitats poblacionals de nematodes són elevades o quan s'utilitza com a únic mètode de control (**Giné et al. 2020**) pel que es podria millorar aplicant formulats comercials a base dels microorganismes de control biològic (**Ornat i Sorribas, 2011**).

Entre els microorganismes capaços de controlar els nematodes fitoparàsits es troben els bacteris, els fongs i els actinomicets. Els bacteris no patògens poden actuar de manera antagònica per diverses vies: induint resistència vegetal (resistència sistèmica o induïda); degradant compostos de senyalització que atrauen als nematodes; o establint-se a les arrels bloquejant així l'entrada de juvenils. Alguns microorganismes actuen produint compostos tòxics pels nematodes i altres, els parasiten, com és el cas dels fongs. Entre els agents biològics més prometedors pels RKN es troben fongs dels gèneres *Purpureocillium* i *Trichoderma* i rizobacteris com *Bacillus firmus*, que es comercialitzen en l'actualitat (**Lamovsek et al., 2013**).

1.3.1. *Bacillus firmus* soca I-1582

Bacillus firmus és un bacteri gram-positiu que forma espores del qual només certes soques presenten activitat nematicida (**Wilson i Jackson, 2013**). Pertany a la família *Bacillaceae* i es troba present de forma natural al sòl, la rizosfera i el medi aquàtic (**Tirafferri et al., 2012**). Aquest tipus de bacteris es consideren promotors del creixement de la planta (PGPB) per la qual cosa, en la seva presència és possible observar beneficis en el contingut de nutrients minerals essencials (nitrogen, fòsfor, ferro...), en la quantitat de biomassa i en la llargada d'arrels i brots, així com millores en la

germinació i resistència a diversos agents nocius externs, entre d'altres **(Mingunova i Sasanelli, 2021)**.

La soca I-1582 d'aquest bacteri ha estat aïllada i seleccionada per la seva activitat nematocida. Actua trencant les parets dels ous de nematode causant la seva mort. A més, el fet que és un organisme que es desenvolupa a la rizosfera de les plantes evita la infecció dels nematodes. No obstant, per tal que la seva activitat sigui eficaç ha d'entrar en contacte amb l'arrel abans que es produeixi la infecció del nematode, ja que no pot actuar si aquest ja ha penetrat l'arrel. També té efectes positius sobre el desenvolupament de les arrels, la planta i el seu rendiment degut a la producció de determinades fitohormones com l'àcid indolacètic (IAA) **(Pieterse et al., 2014)**.

Estudis en tomàquet han mostrat una excel·lent activitat nematocida enfront *Meloidogyne* i també s'ha demostrat la seva eficàcia en el control d'algunes espècies en cultius de cogombre, carbassó, meló, síndria, pebrot, albergínia i enciam tant en camp com en hivernacle **(Tiraferri et al., 2012)**. Altres estudis de *B. firmus* I-1582 marcat amb GFP han demostrat la capacitat d'aquest per degradar la closca dels ous i colonitzar aquests i les arrels de la planta, tot i que, s'ha vist que no en tots els cultius tenen el mateix grau de colonització ni la capacitat d'induir la resistència sistèmica **(Ghahremani et al., 2020)**.

Aquesta substància activa està aprovada pel seu ús fitosanitari per la Unió Europea tal com es contempla al reglament d'execució (RE) 366/2013 **(DOUE, 2013)**.

1.3.2. *Purpureocillium lilacinum* soca 251

Purpureocillium lilacinum, anomenat anteriorment *Paecilomyces lilacinus* és un fong de la família *Trichocomaceae* existent al sòl de forma natural que té un gran interès científic pel seu antagonisme enfront els nematodes paràsits de plantes **(Vinces, 2019)**. És un fong sapròfit, que es caracteritza pel color rosat de les seves colònies **(Perdomo et al., 2012)**.

La seva acció nematocida consisteix en infectar diferents estadis del desenvolupament dels nematodes, especialment s'alimenta dels ous ja que és l'estadi menys mòbil, però també de juvenils, causant la seva mort. Els avantatges principals del seu ús són: la reducció de la taxa de multiplicació dels nematodes, la fàcil manipulació i baixa dosificació i el potencial que té per incrementar la collita millorant el vigor i salut de les arrels **(Bayer CropScience, 2021)**. A més, s'ha

vist que durant el seu creixement produeix metabòlits secundaris que impedeixen que el nematode trobi les arrels (Farfan, 2011).

Experiments en camp realitzats per Rojas (2017) mostren reduccions significatives de l'índex d'agalles en tomàquet respecte al control amb un 58,4% d'eficàcia. En aquests també es van observar efectes positius a la part aèria de la planta, tals com un creixement major i uns resultats superiors en quant a l'alçada, pes, biomassa i producció obtingudes. No obstant, la seva presència en el sòl no és garantia pel control eficaç dels RKN ja que en molts casos es requereixen múltiples aplicacions de conidis viables (Gortari i Roque, 2016).

La soca 251 d'aquest fong conté una quantitat de espores viables de $4,7 \cdot 10^{10}$ UFC/g i està registrada com a producte fitosanitari essent autoritzada únicament per usos nematicides al RE-540/2011 (DOUE, 2011).

1.3.3. *Trichoderma asperellum* soca T34

Trichoderma fa referència a un gènere de fongs pertanyents a la família dels *Hypocreaceae* que inclouen diferents formes de vida: sapròfita, micoparàsita o simbiònt. S'associen a la rizosfera i es consideren agents de control biològics eficaços per a varis patògens de plantes (Martínez-Medina, et al., 2017). Alhora, es coneix que algunes soques són capaces de millorar el creixement de les plantes i activar mecanismes de defensa induïda d'aquesta (ISR). Els ISR venen regulats principalment per quatre senyals hormonals: àcid abscísic (ABA), àcid salicílic (AS), àcid jasmònic (AJ) i etilè (ET) (Grant i Jones., 2009) que interactuen entre elles adaptant-se a les necessitats del moment.

La soca T34 del fong *Trichoderma asperellum* és un agent de control biològic desenvolupat per Biocontrol Technologies S.L (Universitat de Barcelona). Està composta per conidis secs, concretament conté una concentració de 10^{12} UFC/Kg (Biocontrol Technologies, 2021). Aquest microorganisme inoculat en el substrat indueix resistència sistèmica a la planta i actua com agent de control biològic enfront a diverses malalties associades als cultius (Casanova et al., 2008). Martínez-Medina et al. (2016) va analitzar les alteracions hormonals de la planta en les rutes de l'àcid salicílic i l'àcid jasmònic en la interacció planta-fong-nematode, i van concloure que la interacció del fong amb la planta aporta protecció al incrementar l'expressió de gens implicats en aquestes vies metabòliques incrementant la resistència de la planta envers el nematode. No

obstant, no totes les espècies i aïllats capaços de induir resistència a una espècie vegetal ho són a totes. Per exemple T34 inductor de resistència en tomàquet en front a *Meloidogyne* no ho és en cogombre (**Pocurull et al. 2020**).

L'ús de Trichoderma per combatre nematodes no està aprovat a la unió europea, sinó que la legislació vigent només permet l'ús de determinades soques per tractar els efectes nocius d'altres fongs (**Pocurull et al., 2020**). La soca T34 Biocontrol està certificada pel seu ús com a bio-fungicida en producció agrícola amb el nº de registre ES-00283 (**MAPA, 2016**).

Tenint en compte els resultats d'estudis previs, és important determinar a quines espècies hortícoles s'indueix resistència per part de microorganismes a fi d'aprofitar la interacció pel control del nematode.

2. Objectius

L'objectiu general del treball va ser avaluar la capacitat de tres productes fitosanitaris comercials a base dels microorganismes *Bacillus firmus*, *Purpureocillium lilacinum* i *Trichoderma asperellum* d'induir resistència envers nematodes de l'espècie *Meloidogyne incognita* en cultius de gran importància econòmica pertanyents a la família de solanàcies (tomàquet i pebrot) i cucurbitàcies (meló i síndria).

Per tal d'aconseguir l'objectiu general es van analitzar els següents paràmetres del nematode:

- La infectivitat, a través d'un recompte del nombre de masses d'ous produïdes per planta.
- La reproducció, quantificant el nombre d'ous produïts per planta.
- La fertilitat, calculada a partir de la relació entre el nombre d'ous i el nombre de masses d'ou per planta.

3. Materials i mètodes

3.1. Material vegetal, productes comercials a base de microorganismes i nematode

El material vegetal emprat per la realització d'aquest estudi va ser tomàquet cv. Durinta; pebrot cv. Tinsena; meló cv. Charentais; síndria cv. Sugar baby.

Els productes comercials a base de microorganismes utilitzats van ser: T34 Biocontrol (T34), a base de *Trichoderma asperellum* soca T34 i comercialitzat per Biocontrol Technologies; BioAct (PL), a base de *Purpureocillium lilacinum* soca 251 i comercialitzat per Bayer CropScience; i Votivo (BF), a base de *Bacillus firmus* soca I-1582 i comercialitzat per BASF.

La població Agròpolis de *M. incognita* utilitzada en els assajos es mantenia multiplicant-se en tomàquet a Agròpolis.

3.2. Assajos

Els assajos es van dur a terme als laboratoris i cambres climàtiques del Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia i de l'Escola d'Enginyeria Agroambiental i de Biosistemes de Barcelona de la Universitat Politècnica de Catalunya. Es va fer un assaig per cada espècie vegetal. Cada assaig constava de 4 tractaments, tres corresponents a cada producte comercial a base de microorganismes i un control sense tractar per a comparar. Cada tractament constava de 20 repeticions.

El procediment i la cronologia de cada assaig va seguir l'esquema que es mostra a la *Figura 7*.

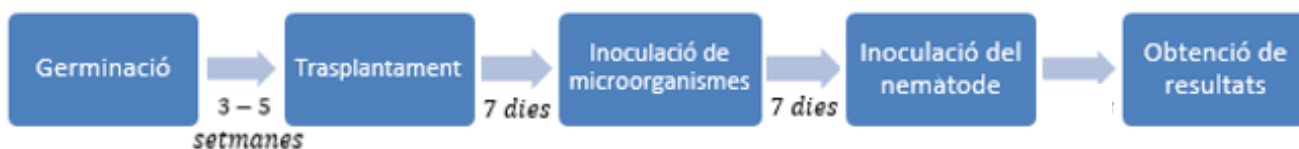


Figura 7. Esquema de les fases a seguir per dur a terme l'experiment.

3.2.1. Sembra, germinació i trasplantament

Llavors de tomàquet cv. Durinta, pebrot cv. Tinsena, meló cv. Charentais i síndria cv. Sugar baby van ser esterilitzades en una solució de lleixiu comercial al 25% en agitació durant un minut. Posteriorment, es van realitzar tres rentats amb aigua destil·lada estèril d'un minut cadascun, per tal d'eliminar les restes de lleixiu que poguessin quedar. Tot el procés es va fer en condicions d'asèpsia en la cambra de flux laminar. Un cop esterilitzades, les llavors van ser sembrades en vermiculita, prèviament esterilitzada dos cops durant 1 h a 121 °C amb una diferència de 24 h. Les llavors es van dipositar en la superfície de la vermiculita humitejada i posteriorment es van cobrir amb vermiculita, es va humitejar la part superior i es van mantenir a la cambra climàtica de germinació a 25 °C, 60% d'humitat relativa i un fotoperíode de 16h:8h (llum:foscor). Quan les plàntules tenien la segona fulla veritable estesa, es van extreure de la safata, amb cura per evitar danyar les arrels, i van ser trasplantades a contenidors de 200 cm³ de capacitat que contenien sorra esterilitzada com a substrat (*Figura 8*). Les plantes es van mantenir en cambra climàtica en les mateixes condicions descrites anteriorment, van ser regades segons les necessitats hídriques i fertilitzades dos cops per setmana amb solució nutritiva Hoagland.



Figura 8. Plantes de pebrot cv. Tinsena just després de trasplantar (**Font pròpia**).

3.2.2. Tractament amb els formulats comercials a base de microorganismes

Els tractaments es van fer regant cada planta amb una suspensió aquosa de 20 mL que contenia 10^9 unitats formadores de colònies (UFC) de BF, de $7,5 \cdot 10^5$ UFC de PL o $2 \cdot 10^6$ UFC de T34, segons les indicacions del format. Les plantes del tractament control van rebre el mateix volum d'aigua. A l'Annex A es troben detallats els càlculs amb que es van obtenir les concentracions necessàries de cada inòcul i la viabilitat d'aquests, que va ser de 92%, 100% i 82,5% per BF, PL i T34 respectivament.

Per tal de garantir que inoculàvem amb els microorganismes seleccionats, les colònies aïllades dels medis de cultiu on es va avaluar la seva viabilitat es van prendre amb una nansa estèril, es van dipositar a sobre de paper de filtre estèril que recobria un embut esterilitzat i es van realitzar 3 rentats amb 1 mL d'aigua destil·lada estèril. Posteriorment, les colònies es van introduir en un tub eppendorf, es van liofilitzar i conservar a -20 °C fins que les mostres van ser processades per identificar els microorganismes per tècniques moleculars, com s'explica en l'apartat següent.

3.2.3. Extracció de DNA i detecció dels microorganismes mitjançant PCR

L'extracció de DNA es va realitzar segons el procediment de **López-Llorca et al. (2010)**. Es van prendre 50 mg de cada mostra, prèviament triturades amb nitrogen líquid. Es va afegir sorra de mar esterilitzada i 500 µL de CTAB Buffer (Tris-HCl 100mM pH 8.4; NaCl 1,4 M; EDTA 25 mM pH 7.5; bromur d'acetil-trimetil-amoni (CTAB) al 2% i polivinilpirrolidona (PVP) al 2%) i es van incubar en la Thermomixer a 65 °C durant 1 hora a 900 rpm. Posteriorment es van afegir 365 µL de fenol : cloroform (1:1), es van agitar i centrifugar durant 10 minuts a 10000 rpm. Es va recollir la fase superior i es van afegir 200 µL de Cloroform: Isoamiliálcohol (24:1) i es va agitar i centrifugar durant 10 min a 10000 rpm. Tot seguit, per tal de precipitar el DNA es van afegir 750 µL d'isopropanol a -20 °C i es va deixar refredar a aquesta temperatura durant 30 minuts, després dels quals es va centrifugar durant 20 min a 10000 rpm i en fred (4 °C). Es va realitzar un rentat amb 500 µL d'etanol al 70% a -20 °C, es va decantar l'etanol i deixar eixugar el pellet a la campana. Es van dissoldre 2 µL de RNAsa A (Sigma 32.5 mL/mg) en 18 de TNE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0). El pellet resultant es va dissoldre en 200 µL TNE 1X i es va afegit 1 µL de la solució anterior RNAsa A : TNE 1X (2:18) i es va incubar en la Thermomixer a 37 °C durant 1 hora en agitació suau. Seguidament, es van afegir 200 µL de Cl i es va centrifugar a 10000 rpm durant 10 min, es va recollir el sobrenedant i el DNA es va precipitar amb 500 µL d'etanol absolut a -20 °C. Es van deixar durant

30 min a -20 °C i es va centrifugar a -4 °C durant 10 min a 10000 rpm. Finalment, el pellet es va resuspendre en 50 µl d'aigua lliure de nucleases i es va mantenir a -20 °C fins al seu ús. La quantitat i qualitat del DNA va ser avaluada mitjançant un NanoDrop one 2000 (Thermo Fisher Scientific).

La detecció de *T. asperellum* es va estimar utilitzant els encebadors i el protocol de **Gerin et al. (2018)**, la de *P. lilacinum* per **Atkins et al. (2005)** i la de *B. firmus* per **Mendis et al. (2018)**.

Per tal d'assegurar que els encebadors emprats per la realització de la PCR (*Taula 1*) amplificaven específicament els microorganismes escollits, es van comparar amb altres seqüències a la base de dades Nacional Center for Biotechnology Information mitjançant l'eina BLAST, que troba regions de semblança local entre seqüències i les compara.

Taula 1. Encebadors utilitzats per a la PCR.

Micro-organisme	Nom dels encebadors	Seqüència dels encebadors (5'-3')	Longitud (pb)	Longitud regió amplificada (pb)	Referència
T34	Ta_rpb2_fw	GGAGGTCGTTGAGGAGTACGAA	22	144	Gerin et al. (2018)
	Ta_rpb2_rev_3	TTGCAGATAGGATTTACGACGAGT	24	144	
PL	PLrtF	CTCAGTTGCCTCGGCGGGAA	20	94	Atkins et al. (2005)
	PLrtR	GTGCAACTCAGAGAAGAAATTCCG	24	94	
BF	Votivo_2F	CTCCAATTCCTAATATCCTGCAAAG	25	93	Mendis et al. (2018)
	Votivo_2R	GGAAAGTCACGGGACAGTTAT	21	93	

Per la realització de les PCRs es va utilitzar DNAg (100ng/µL), 5 µL de Buffer Green (20 mM de MgCl₂), 1 µL de dNTPs (10 mM), 0,25 µL de Taq Polimerasa (5U DreamTaq, Fisher Scientific), encebadors "forward" i "reverse" per a cada un dels microorganismes a una concentració final de 250 nM per T34 i BF i 900 nM per PL i aigua miliQ fins arribar a un volum final de 50 µL. La reacció es va portar a terme en un termociclador PTC-200 de BioRad amb els següents programes: i) T34: 95 °C durant 2 minuts, seguits de 40 cicles de 5 segons a 95 °C i 64,5 °C durant 30 segons (**Gerin et al., 2018**); ii) BF: 95 °C durant 15 minuts seguits de 39 cicles a 95 °C de 15 segons i 58 °C durant 1 minut (**Mendis et al., 2018**); iii) PL: 50 °C durant 2 minuts, 95 °C durant 10 minuts seguits de 50 cicles a 95 °C de 5 segons cadascun i 60 °C durant 15 segons (**Atkins et al., 2005**).

Els resultats de les PCRs es van visualitzar mitjançant l'adició de 10 µL de producte de la PCR carregats en un gel d'agarosa al 2% amb 4 µL de Sybr Safe com agent intercalant i es van sotmetre a 120V durant 45 minuts, després dels quals es van visualitzar els resultats en un transil·luminador.

3.2.4. Inoculació del nematode

Dues setmanes després del trasplantament, cada planta va ser inoculada amb 200 J2 de *Meloidogyne incognita*. Per fer-ho, es van fer 2 forats oposats a la sorra a ambdós costats de la tija on es va repartir la suspensió líquida.

Per obtenir els J2, arrels de tomàquet cv. Durinta procedent d'Agropolis, es van macerar en una solució de lleixiu al 5% en una liquidadora durant 3 períodes de 10 segons cadascun, i posteriorment es va deixar reposar durant en 10 min. Un cop transcorregut aquest temps, la suspensió es va filtrar per un tamís de 74 µm de llum de porus, per tal de separar les restes vegetals, i seguidament es va filtrar per un tamís de 25 µm on es van retenir els ous (**Hussey i Barker, 1973**). Els ous es van depositar en safates Baermann per permetre l'emergència del J2, que van ser retinguts diàriament en un tamís de 25 µm, descartant els J2 recollits les primeres 24h, i conservats a 9 °C fins la seva utilització.

Atès que *M. incognita* és un organisme poiquiloterm, el seu desenvolupament és depenent de la temperatura. Per tant, els dies que triga en completar el seu cicle vital depèn del ritme amb què acumula temperatura per sobre de la temperatura basal (T_b) fins assolir la temperatura acumulada necessària també coneguda com a constant tèrmica (S), i que es mesura en graus dia (DD). En condicions de temperatura constant (T_m), els dies necessaris per a que el nematode completi un cicle de vida es calcula segons la següent expressió:

$$\text{Dies per completar el cicle} = \frac{S}{T_m - T_b}$$

Com a referència per a estimar la durada dels assajos en els diferents cultius, es van utilitzar les dades dels models fenològics de síndria cv. Sugar baby i de cogombre, que és vàlid per pebrot i tomàquet, proposats per **Giné (2016)**, que són $T_b = 14$ °C, $S = 500$ DD i $T_b = 11,4$ °C, $S = 500$ DD, respectivament. Per tant, els dies en què completarà el cicle en aquests cultius serà el següent:

$$\text{Cucurbitàcies} = \frac{500 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{dia}}{(25 - 14) \text{ }^{\circ}\text{C}} \cong 46 \text{ dies} \quad \text{Solanàcies} = \frac{500 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{dia}}{(25 - 11.4) \text{ }^{\circ}\text{C}} \cong 37 \text{ dies}$$

Per tal de finalitzar l'experiment amb més exactitud, es van enregistrar les temperatures amb sondes PT100 (Campbell Scientific), i les plantes foren retirades per a l'observació de resultats un cop assolides les constants tèrmiques requerides per cada tipus de cultiu.

El primer que es va avaluar va ser la infectivitat dels nematodes. Les arrels de les plantes foren rentades suaument i submergides en una solució de 50 mg/mL d'erioglaucina durant 20 min per tal de tenyir les masses d'ous amb la seva coloració blava característica (**Omwega et al., 1988**). Un cop eixugades es va mesurar el pes de cada mostra i procedir al recompte de masses (*Figura 9*).



Figura 9. Arrels de tomàquet cv. Durinta sense tractar on es poden visualitzar les masses d'ous tenyides amb erioglaucina (**Font pròpia**).

Posteriorment, la reproducció es va obtenir seguint el procediment descrit per **Hussey i Barker (1973)** en què els ous foren extrets de les arrels mitjançant la maceració en liquidadora en una solució

de lleixiu comercial al 10% durant 10 minuts. Transcorregut aquest temps, es va passar la solució per un tamís de 74 μm i seguidament per un de 25 μm per tal de recollir els ous alliberats. Als ous presents al tamís se'ls va passar aigua per tal d'eliminar el NaOCl residual i recollir-los en un vial per a recomptar-los al microscopi òptic en una càmera de recompte.

Finalment, la fertilitat es va calcular a partir de la relació entre el nombre d'ous totals per planta i el nombre de masses d'ou per planta.

3.2.5. Anàlisis estadístiques

El tractament de les dades es va dur a terme mitjançant l'aplicació R Commander (versió 4.1.0) del programari R. Inicialment es va determinar la normalitat de les dades i l'homogeneïtat de les variàncies i, posteriorment, en funció dels resultats obtinguts, es va fer una anàlisi paramètrica (t de Student) o no paramètrica (Wilcoxon) comparant el nombre de masses d'ou i d'ous per planta i el nombre d'ous per massa d'ous desenvolupats en les plantes del tractament control i cada tractament amb microorganisme. Totes les anàlisis es van fer sobre un interval de confiança del 95%.

4. Resultats

El resultat de la verificació de que els formulats emprats contenien els microorganismes amb què es volia inocular a partir de la detecció mitjançant PCR es mostren a continuació.

La qualitat del DNA dels microorganismes que es va obtenir amb el NanoDrop va ser la que es mostra a la *Taula 2*.

Taula 2. Quantificació de T34, PL i BF en NanoDrop on ng/mL indica la concentració en què es troba cada microorganisme i 260/280 la presència d'RNA i la qualitat del material.

Microorganisme	ng/mL	260/280
T34	225,3	1,85
PL	38,8	1,98
BF	68,7	1,94

Els resultats de la PCR van demostrar que vàrem inocular amb els microorganismes desitjats (*Figura 10*) ja que es troben els amplicons específics de T34 (144pb) de PL (94 pb) i de BF (93 pb) als carrils on vam inserir el DNAG d'aquests, respectivament.

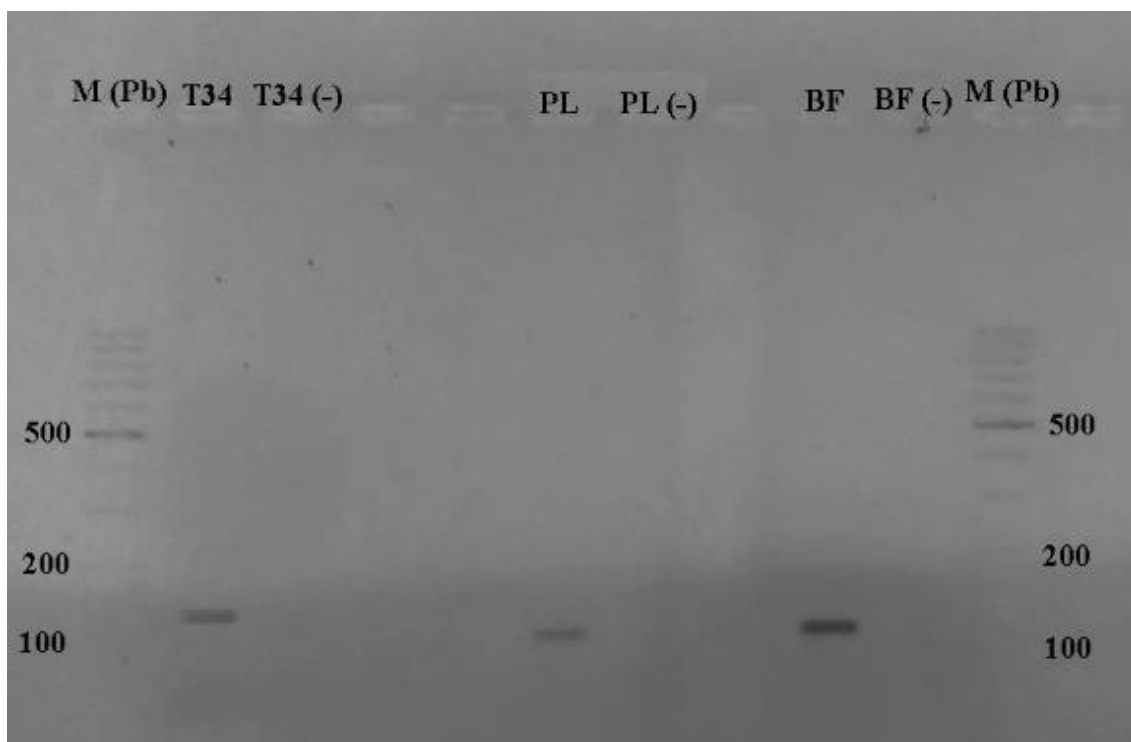


Figura 10. Gel d'electroforesi al 2% d'agarosa carregat amb 10 μ L de producte de PCR. M: marcador de pes molecular conegut; T34: DNAg de *Trichoderma asperellum* soca T34 amplificat amb els encebadors específics; T34 (-) control negatiu de la PCR de T34; BF: *Bacillus firmus* soca I-1582 amplificat amb els encebadors específics; BF (-) control negatiu de la PCR de BF; PL: *Purpureocillium lilacinum* soca 251 amplificat amb els encebadors específics; PL (-) control negatiu de la PCR de PL.

Els resultats relatius al pes radicular, la capacitat infectiva, reproductora i la fertilitat de les femelles en els diferents cultius tractats i no tractats amb els diferents microorganismes es detallen a l'*Annex B*. Els resultats mostren que l'aplicació de T34 o BF en els diferents cultius no ha tingut el mateix efecte sobre el nematode, però sí el tractament amb PL, que no va afectar la capacitat infectiva i reproductora del nematode, ni tampoc la fertilitat de les femelles, independentment del cultiu tractat (*Taula 3*). Val a dir, que el pes radicular de la majoria de cultius tractats va ser inferior al control sense tractar. La longitud de les arrels, tot i que no es va mesurar, va ser menor en relació al control sense tractar, el que podria explicar part dels resultats dels experiments (*Figura 11*).

Taula 3. Pes d'arrel, infectivitat, reproducció i fertilitat del nematode en els cultivars susceptibles de pebrot (Tinsena), tomàquet (Durinta), síndria (Sugar baby) i meló (Charentais) no tractats (Control) o tractats amb T34 Biocontrol (T34), BioAct (PL) o Votivo (BF) una setmana després de trasplantar el cultiu en contenidors de 200 cm³ de capacitat, i inoculats una setmana després amb 200 J2 de *M. incognita* per planta i mantinguts en cambra climàtica fins que el nematode completés una generació.

Cultiu	Tractament	Nº repeticions	Pes (g)	Infectivitat (nº masses)	Reproducció (nº ous)	Fertilitat (nº ous / nº masses)
Pebrot Tinsena	Control	16	0,8430 ± 0,06	2 ± 0,5	653 ± 175	300 ± 61
	T34	16	1,8212 ± 0,18*	4 ± 0,5 *	1709 ± 240 *	448 ± 48
	PL	16	1,1703 ± 0,01 *	3 ± 0,5	716 ± 119	215 ± 29
	BF	12	1,0896 ± 0,11 *	1 ± 0,3	283 ± 76	226 ± 32
Tomàquet Durinta	Control	16	0,8943 ± 0,07	70 ± 15	25232 ± 2343	375 ± 36
	T34	16	0,6083 ± 0,03 *	75 ± 3,8	31602 ± 1733	422 ± 21
	PL	16	0,5891 ± 0,04 *	68 ± 3,5	22286 ± 1718	333 ± 23
	BF	16	0,2947 ± 0,03 *	18 ± 3 *	4080 ± 722 *	255 ± 37 *
Síndria Sugar Baby	Control	10	0,4211 ± 0,05	14 ± 3,5	8155 ± 2103	564 ± 59
	T34	15	0,5076 ± 0,04	6 ± 0,8	3296 ± 618	522 ± 75
	PL	14	0,2531 ± 0,03 *	9 ± 1,6	4711 ± 753	634 ± 102
	BF	3	0,1410 ± 0,02 *	3 ± 1,2	1289 ± 610	418 ± 100
Meló Charentais	Control	10	0,7871 ± 0,04	17 ± 1,9	10473 ± 1902	599 ± 64
	T34	10	0,6757 ± 0,08	11 ± 1,9 *	7124 ± 1639	704 ± 73
	PL	10	0,4591 ± 0,03 *	14 ± 1,9	7297 ± 1077	560 ± 86
	BF	10	0,3655 ± 0,02 *	27 ± 3,2 *	10496 ± 1583	409 ± 39 *

Cada dada es la mitjana ± l'error estàndard de les diferents repeticions. Els valors de la mateixa columna i cultiu seguits de d'asterisc indiquen diferències ($p < 0,05$) entre els tractaments d'un mateix cultiu respecte el control, segons la prova paramètrica t de Student o la prova no paramètrica Wilcoxon.

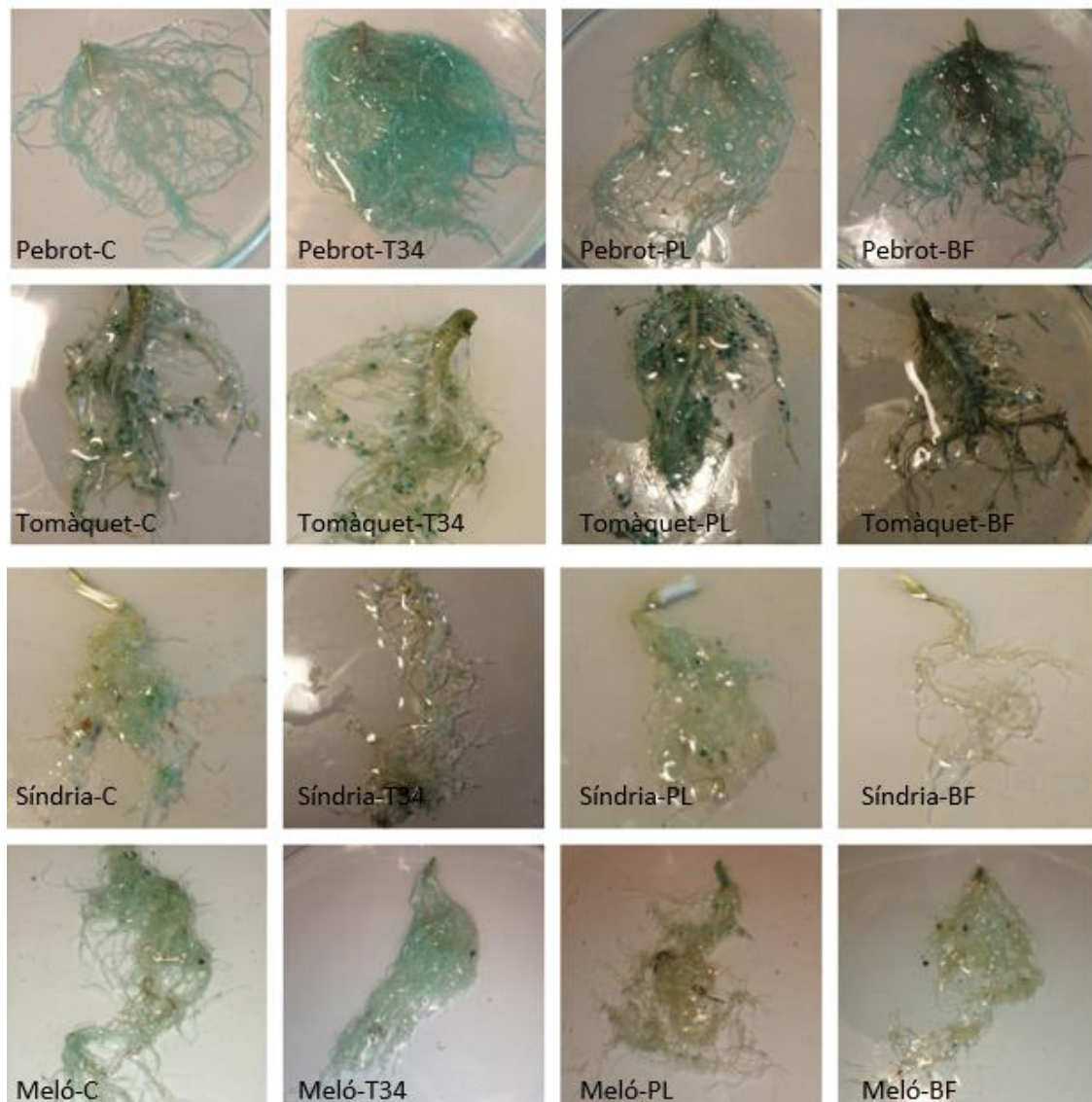


Figura 11. Arrels de pebrot cv. Tinsena, tomàquet cv. Durinta, síndria cv. Sugar baby i meló cv. Charentais sense tractar i tractades amb T34, PL i BF cop finalitzat l'experiment (**Font pròpia**).

En el cultiu de pebrot, la infectivitat del nematode en el tractament control va ser força baixa, al voltant de l'1% dels J2 inoculats. El nematode va infectar i reproduir-se més ($p < 0,05$, $p < 0,01$) en les plantes tractades amb T34 que en les plantes no tractades, sense detectar-se diferències en la fecunditat de les femelles. Les plantes tractades amb PL i BF no van mostrar cap efecte sobre el

nematode, però sí un augment del pes d'arrel ($p < 0,05$) del 34% i 25%, respectivament, respecte al de les plantes no tractades.

Pel que fa al cultiu de tomàquet, l'únic tractament que va tenir efecte sobre el nematode va ser BF, reduint la infectivitat en un 81% ($p < 0,01$), la reproducció en un 87% ($p < 0,01$), i la fertilitat en un 32% ($p < 0,05$) respecte les plantes no tractades. El sistema radicular de les tomaqueres no tractades estava poc desenvolupat, i encara menys en les plantes tractades, diferint del control sense tractar ($p < 0,05$).

Els tractaments T34, PL i BF no van tenir cap efecte significatiu ($p > 0,05$) sobre la infectivitat, reproducció i fertilitat del nematode en el cultiu de síndria. En el cas de BF i PL el pes va sortir un 66% ($p < 0,01$) i un 40% ($p < 0,05$) inferior que en el cultiu sense tractar, respectivament. A més, en el tractament amb BF van morir la major part de les plantes (80%), quedant només 3 en finalitzar l'experiment.

En meló, les plantes tractades amb T34 van presentar un 38% menys d'infecció ($p < 0,05$) que les plantes no tractades, però no va afectar ni la reproducció ni la fertilitat de les femelles. La infectivitat del nematode en les plantes tractades amb BF va ser un 36% major que en el control ($p < 0,05$), però no va haver-hi diferències en reproducció ($p > 0,05$), essent la fertilitat un 32% menor ($p < 0,05$) en les plantes tractades que en les no tractades. El pes de les arrels de les plantes tractades amb BF va ser un 54% menor ($p < 0,01$) que el de les plantes control.

5. Discussió

Els resultats d'aquest estudi han mostrat que no tots els formulats estudiats tenen la capacitat d'induir resistència al nematode en les quatre espècies i cultivars vegetals utilitzats, i que la resposta de la planta depèn de la interacció específica entre la planta i el microorganisme, com ha estat posat de manifest en treballs anteriors (**Gharhemani et al., 2020; Pocurull et al., 2020**). Conseqüentment, l'optimització en l'ús d'aquests productes per maximitzar la seva eficàcia de control estarà condicionada pel resultat de la seva interacció amb l'espècie vegetal que es consideri. Els microorganismes que indueixen resistència al nematode podrien ser aplicats en pre-trasplantament del cultiu per tal de reduir la capacitat infectiva i/o reproductora del nematode, reduir la severitat de la malaltia i afavorir la colonització dels ous, per aquells que tenen capacitat de fer-ho, reduint així la taxa de multiplicació de la població i disminuir les pèrdues de producció del conreu i dels que el succeeixin per enfrontar-se a una menor densitat de població just abans de trasplantar. En altres casos, com per exemple l'aplicació de T34 en pebrot, l'efecte ha estat clarament negatiu, ja que la infecció i la reproducció del nematode ha estat major que en les plantes no tractades, tot i que també va augmentar la biomassa radicular. Resultats similars van ser obtinguts per **Herrera-Parra et al. (2017)** utilitzant diverses espècies de *Trichoderma* en pebrot. En tomàquet, en canvi, **Pocurull et al. (2020)** van reportar reduccions del 71% i 54% en el nombre de masses d'ous i d'ous per planta, respectivament, gràcies a l'ús de T34 i també van observar que no va tenir efecte contra el fong *Pochonia chlamydosporia*, un paràsit d'ous del nematode i inductor de resistència en tomàquet quan s'aplica una setmana abans de trasplantar (**Gharhemani et al., 2019**), estudi interessant ja que demostra que tot i ésser T34 un biofungicida no té perquè afectar als microorganismes que es troben al sòl i actuen induint el priming de la planta. Altres experiments, com el d' **Affokpon et al. (2011)** van mostrar que diverses soques de *T. asperellum* van tenir la capacitat d'inhibir la reproducció dels nematodes, reduir la severitat de la malaltia i d'augmentar el rendiment del cultiu de tomàquet. En el nostre estudi, però, no es va observar cap efecte, possiblement degut a problemes per establir-se el fong en l'arrel a conseqüència del pobre desenvolupament radicular observat al final de l'experiment. En altres casos, com l'aplicació de T34 en síndria o meló, l'efecte sobre el nematode no és conclouent. En el present estudi, l'efecte va ser nul o insuficient, ja que en síndria no es va veure cap efecte o només va afectar la infectivitat en meló, el que significa que la densitat de població al final del cultiu no difereix de la del control sense

tractar i per tant no hi hauria cap efecte protector sobre el cultiu següent. **Area (2020) i Nieto (2020)** no van detectar cap efecte en meló i només sobre la reproducció en síndria, respectivament. Com en el cas del tomàquet, el pobre desenvolupament radicular podria haver afectat la colonització de les arrels per part del fong afectant així la resposta de la planta. Així doncs, considerant el nivell de coneixement actual, l'ús de T34 en aquests cultius no seria una garantia de protecció envers el nematode, pel que caldria repetir l'assaig, fent l'aplicació del producte quan la planta tingui un bon creixement radicular, i determinar el grau de colonització de les arrels per part del fong mitjançant qPCR per estimar el possible efecte de la mateixa en la resposta de la planta com apunta **Dhimdi (2021)**.

BF va ser el format que millors resultats va donar. En pebrot va tenir el mateix efecte que PL, únicament les arrels varen incrementar el seu pes de forma significativa. Un estudi de **Requena (2013)** on es van utilitzar diversos microorganismes antagonistes de nematodes i diferents combinacions d'aquests van mostrar que l'addició de *Bacillus firmus* a una combinació de *Paecilomyces lilacinus* i *Trichoderma harzianum* en pebrot tampoc va suposar una millora en l'efectivitat de la combinació dels dos fongs. No obstant, es tractava d'una soca diferent a la del format emprat en aquest estudi i la concentració aplicada de *Bacillus firmus* era inferior ($5 \cdot 10^7$ UFC/g d sòl) a l'emprada en el nostre experiment (10^9 UFC/planta). Pel que fa al cultiu de tomàquet, els resultats van mostrar reduccions significatives tant en el nombre de masses (infectivitat) com en el recompte d'ous (reproducció) i el nombre d'ous per cada massa (fertilitat) en el tractament amb BF. Aquests resultats són similars als de **Terefe et al. (2008)** que van reportar la eficàcia d'un altre format de *Bacillus firmus* (BioNem) enfront *M. incognita* en tomàquet, on van aconseguir reduccions en l'eclosió d'ous, inhibició de la mobilitat dels J2 en proves de laboratori; disminució de la formació d'agalles, de la població final de nematodes i el nº d'ous en hivernacle i camp obert, on també va augmentar l'alçada i biomassa de les plantes. **Gahremani et al. (2020)** van estudiar també l'efecte de BF en tomàquet amb èxit, concretament l'efecte sobre els ous dels nematodes i la colonització d'arrels de tomàquet en experiments d'arrel dividida en els quals, van poder demostrar que BF va ser capaç de degradar les closques dels ous, colonitzar aquests i les arrels de la planta i induir resistència sistèmica. En el cas del cultiu de síndria, no van quedar suficients mostres per realitzar un anàlisi estadístic conclouent ja que la majoria de les plàntules van morir abans de la finalització de l'experiment. Com ja vam comentar, la dosi aplicada d'aquest microorganisme va ser la utilitzada en un experiment de tomàquet, pel que podria haver generat

fitotoxicitat per ser massa elevada (**Terefe et al., 2008**) per aquest altre cultiu i com a conseqüència haver causat la mort de les plantes. En meló es va trobar un increment significatiu en el nombre de masses de les plantes inoculades respecte les no inoculades. Encara que el nº d'ous no va diferir de forma significativa, es va poder determinar una reducció en la fertilitat de les plantes tractades, fet que concorda amb un dels mecanismes que utilitza aquest microorganisme per controlar els RKN, que consisteix en trencar la paret dels ous. Per això, tot i l'elevada quantitat de masses, es varen trobar pocs ous/massa.

Pel que fa al format PL, aquest no va mostrar cap efecte sobre les variables analitzades en cap cultiu. En pebrot no va presentar diferències en quant a la infecció, reproducció i fertilitat respecte les plantes control però si va haver-hi un augment significatiu del pes radicular, tal com es reporta en altres estudis com el de **Fernández-Santillán et al. (2016)**. Tot i així, al contrari que en el nostre cas, en aquest mateix estudi *Paecilomyces lilacinus* sí que mostra una gran eficàcia en el cultiu de pebrot (60,3%) en la reducció de les poblacions finals de *M. incognita* en hivernacle i en la severitat dels símptomes causats, entre altres factors. No obstant, la dosi de *Paecilomyces lilacinus* inoculada en aquest (de 10 Kg/Ha a 40 Kg/Ha) és molt superior a la quantitat emprada en el nostre estudi. A més l'experiment va tenir una durada major (10 setmanes) pel que el nematode pot haver completat més d'una generació i és més probable que el microorganisme hagi pogut controlar la població infectant els ous en aquest temps, obtenint així diferències significatives, ja que el seu mecanisme d'actuació no és basa en induir resistència sinó que és un paràsit d'ous, pel que es poc eficaç a curt termini. En el cas de tomàquet, té sentit que no hi hagi hagut efecte en les plantes tractades respecte el control ja que segons un estudi de **Kiewniek i Sikora (2006)** que es va realitzar en cambres de creixement es va determinar que la dosi efectiva de PL en tomàquet per un control biològic suficient de *M. incognita* és de $1 \cdot 10^6$ UFC/g de sòl, bastant superior a la dosi utilitzada ($7,6 \cdot 10^5$ UFC/planta que es correspon amb aproximadament $2,5 \cdot 10^3$ UFC/g de sòl), tot i ésser la recomanada en la fitxa tècnica del fabricant. **Giné i Sorribas (2016)** van analitzar l'efecte de PL enfront *M. incognita* en una rotació de cultius tomàquet-cogombre obtenint un parasitisme del 94% dels ous per part de PL en condicions *in vitro* però només un 2,6% en parcel·les. Això indueix a pensar que, tot i aplicar les dosis adequades, l'ús d'aquest fong en cultius sota hivernacle està molt condicionat per l'acceptació del sòl i per tant pot ser poc eficaç a la pràctica tot i el seu elevat potencial observat *in vitro*. Per altra banda, estudis comparatius de diferents nematicides en el cultiu de síndria van mostrar que *Paecilomyces lilacinus* no va impedir el desenvolupament de *M.*

incognita, com és el nostre cas, tot i que si es va observar una incidència inferior del nematode respecte a altres tractaments (**Orrala et al., 2016**). En el cas de l'aplicació de PL en melò, no es va poder determinar cap efecte significatiu respecte a la infectivitat, reproducció ni fertilitat, però el pes de les arrels sí que es va veure reduït significativament. Aquests resultats són contraris als reportats en aquest cultiu per **Cárdenas (2006)** qui sí que va trobar reduccions en la infecció per *Meloidogyne*.

El potencial que alguns microorganismes tenen per induir defenses deu ser explorat per a ser utilitzats com eina de control que permeti interferir l'acció d'agents estressants per la planta que redueixin la seva productivitat.

Com consideracions finals, proposaria, com a possible continuació d'aquest projecte, determinar la colonització de l'arrel per part dels microorganismes aplicats, quantificant-los mitjançant qPCR per analitzar si hi ha alguna correlació entre la concentració i l'efecte generat. Així mateix, proposo estudiar la potencial fitotoxicitat que poden causar aquests productes en alguns cultius, com és el cas de BF en síndria, per saber si es deu a components de la formulació i/o per la dosi aplicada, fent experiments comparatius entre el producte comercial i la matèria activa a diferents dosi d'aplicació.

Conclusions

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball s'ha arribat a les conclusions següents:

- L'efecte d'aplicar Votivo, a base de *Bacillus firmus* soca I-1582, y de T34 Biocontrol, a base de *Trichoderma asperellum* soca T34, per induir resistència envers *M. incognita* és dependent de l'espècie vegetal. Mentre que l'aplicació de BioAct, a base de *Purpureocillium lilacinum* soca 251, no ha induït cap resposta en cap cultiu envers el nematode, pel que la seva capacitat antagònica es restringeix a l'acció directa com a paràsit d'ous del nematode.
- L'aplicació de Votivo, a base de *Bacillus firmus* I-1582, redueix la infecció, reproducció i fertilitat de *M. incognita* en tomàquet cv. Durinta, així com la fertilitat en meló cv. Charentais, però no té cap efecte sobre el nematode quan s'aplica en pebrot cv. Tinsena o síndria cv. Sugar baby, pel que seria indicat per a ser aplicat com a inductor de defenses de la planta només en tomàquet.
- L'aplicació de T34 Biocontrol redueix la infectivitat però no la reproducció de *M. incognita* en el meló cv. Chanterais, el que seria insuficient per a gestionar el desenvolupament de les poblacions del nematode en aquest cultiu en condicions de camp.
- La tolerància de la síndria cv. Sugar baby a Votivo és baixa, produint fitotoxicitat en les condicions de l'assaig.

Bibliografia

Referències bibliogràfiques

- Affokpon, A., Coyne, D. L., Htay, C. C., Agbèdè, R. D., Lawouin, L., i Coosemans, J. (2011). *Biocontrol potential of native Trichoderma isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. Soil Biology & Biochemistry*, 43(3), 600-608. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.029>
- Andrés, M. (2002). Estrategias en el control y manejo de nematodos fitoparasitos. En Centro de Ciencias Medioambientales (ccma) (Ed.). *Ciencia y Medio Ambiente - Segundas jornadas científicas sobre medio ambiente del CCMA-CSIC*. Recuperat de <http://hdl.handle.net/10261/128310>
- Argerich, C., i Gaviola, J. C. (2011). Enfermedades y plagas. *Manual de producción de semillas hortícolas. Tomate* [en línia]. [Consulta: 20 abril 2021] Recuperat de https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-8__cap__8-enfermedades_y_plagas.pdf
- Area Manuel, Neus (2020). Efecte combinat de la resistència vegetal conferida per gens R i de la induïda per microorganismes sobre *Meloidogyne* en pebrot i meló. Treball de final de grau. Grau en Enginyeria Agrícola. Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona (EEABB). Universitat Politècnica de Catalunya.
- Argerich, C., i Gaviola, J. C. (2011). Enfermedades y plagas. *Manual de producción de semillas hortícolas. Tomate* [en línia]. [Consulta: 20 abril 2021] Recuperat de https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-8__cap__8-enfermedades_y_plagas.pdf
- Artal, J. (2019). Activadores Inmunológicos “Efecto Priming”: una nueva tecnología al servicio de las plantas: Transferencia tecnológica. *Phytohemeroteca* [en línia], 314, 1. [Consulta: 29 abril 2021] Recuperat de <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/314-diciembre-2019/activadores-inmunologicos-efecto-priming-una-nueva-tecnologia-al-servicio-de-las-plantas>
- Atkins, S. D., Clark, I. M., Pande, S., Hirsch, P. R., & Kerry, B. R. (2005). The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), 257–264. doi:10.1016/j.femsec.2004.09.002
- Bayer CropScience. (2021). *Paecilomyces lilacinus* cepa 251. *Crop Science* [en línia]. [Consulta: 17 maig 2021] Recuperat de <https://www.cropscience.bayer.es/-/media/Bayer%20CropScience/Country-Spain-Internet/labels/BioAct%20hortcolas%20web%202020.pdf?force=1>

- BioAct Prime. (s. d.). Bayer CropScience [en línia]. [Consulta: 3 març 2021]. Recuperat de <https://www.cropscience.bayer.es/Productos/Biologicos/BioactPrime>
- Biocontrol Technologies. (2021). Fungicida biològic T34 Biocontrol. Ficha tècnica. *T34 Biocontrol* [en línia]. [Consulta 22 març 2021] Recuperat de <https://pub.flowpaper.com/docs/https://t34biocontrol-iqv.es/download-zone/recomendaciones-por-cultivo-ES.pdf>
- Cárdenas, D. (2006). *Efecto del hongo Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson sobre el nemátodo de agalla Meloidogyne incognita Chitwood del melón (Cucumis melo Linn.) y la sandía (Citrollus vulgaris Schrad.) en una zona del municipio de Taminango, Nariño*. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño.
- Casanova, E., Segarra, G., Borrero, C., Torras, J., Nogueras, R., Castillo, S., Avilés, M., i Trillas, M. I. (2008). Utilización del agente de control biológico Trichoderma asperellum cepa T34 contra enfermedades de los cultivos. *Phytoma* [en línia], 203. [Consulta: 22 març 2021] Recuperat de <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/203-noviembre-2008/utilizacion-del-agente-de-control-biologico-trichoderma-asperellum-cepas-t34-contra-enfermedades-de-los-cultivos>
- Castillo, P., Verdejo-Lucas, S. Nódulos en las raíces de tomate (*Meloidogyne spp.*). Andrés-Yeves, M. F., i Verdejo-Lucas, S. (2011). *Enfermedades causadas por nematodos fitoparásitos en España* (Vol. 2). Phytoma-España [en línia]. [Consulta: 19 març 2021] Recuperat de <https://www.phytoma.com/tienda/libros/product/enfermedades-causadas-por-nematodos-fitoparasitos-en-espana>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO y Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados, SIOVM. (s.d.). *Melón, Cucumis melo*. Recuperat de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20912_sg7.pdf
- Davis, R. F. (2007). *Effect of Meloidogyne incognita on watermelon yield*. Nematropica. Recuperat de https://www.researchgate.net/publication/259843483_Effect_of_Meloidogyne_incognita_on_watermelon_yield
- Davis, R. F. (2007). Effect of Meloidogyne incognita on watermelon yield. *Nematropica* [en línia] 37,287-93. [Consulta: 30 maig 2021]. Recuperat de https://www.researchgate.net/publication/259843483_Effect_of_Meloidogyne_incognita_on_watermelon_yield
- Dhimdi, M. R. (2021). Capacitat de Trichoderma asperellum per colonitzar el sistema radicular de cultius hortícoles enfront *Meloidogyne* [en línia]. Treball de final de grau. Grau en Enginyeria de Sistemes Biològics. Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona (EEABB). Universitat Politècnica de Catalunya. [Consulta: 15 juny 2021]. Recuperat de <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/337097>

- Diario Oficial de la Unión Europea, DOUE. (2011). *Reglamento de Ejecución (UE) n° 540/2011 de la Comisión, de 25 de mayo de 2011, por el que se aplica el Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas* [en línea]. [Consulta: 3 abril 2021]. Recuperat de <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2011-81129>
- Diario Oficial de la Unión Europea, DOUE. (2013). *Reglamento de Ejecución (UE) n° 366/2013 de la Comisión, de 22 de abril de 2013, por el que se aprueba la sustancia activa Bacillus firmus I-1582, con arreglo al Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y se modifica el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) n° 540/2011 de la Comisión* [en línea]. [Consulta: 3 abril 2021]. Recuperat de <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2013-80753>
- Díaz, I. (2019). Los pimientos vinieron de América y conquistaron el mundo. *Cultura alimentaria* [en línea], vol. 3, 87–99. [Consulta: 17 març 2021]. Recuperat de https://www.mercasa.es/media/publicaciones/257/Cultura_alimentaria_los_pimientos.pdf
- European Statistics, EUROSTAT. (2017). Agricultura [en línea]. [Consulta: 25 març 2021]. Recuperat de <https://ec.europa.eu/eurostat/data/database>
- Expósito A, Pujolà M, Achaerandio I, Giné A, Escudero N, Fullana A.M, Cunquero M, Loza-Alvarez P i Sorribas F.J. (2020). Tomato and Melon Meloidogyne Resistant Rootstocks Improve Crop Yield but Melon Fruit Quality Is Influenced by the Cropping Season. *Front. Plant Sci.* 11:560024. doi: 10.3389/fpls.2020.560024
- Farfan, M. D. (2011). Comportamiento del nemátodo del nódulo *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1049 con 12 productos químicos [en línea]. Trabajo fin de maestría. Maestría en fitopatología. Universidad Nacional Agraria La Molina. [Consulta: 5 abril 2021]. Recuperat de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1760/H10-F2-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Fernández-Santillán, G., Cerna-Rebaza, L., i Chico-Ruíz, J. (2016). Eficacia de *Paecilomyces lilacinus* en el control de *Meloidogyne incognita* que ataca al cultivo de *Capsicum annuum*, “pimiento piquillo”. *Fitosanidad* [en línea]. ISSN: 1562–3009. [Consulta: 13 juny]. Recuperat de <https://www.redalyc.org/comocitar.oi?id=209155121001>
- Food and Agriculture of the United Nations, FAOSTAT. (2009). Datos de cultivos [en línea]. [Consulta: 19 març 2021]. Recuperat de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Food and Agriculture of the United Nations, FAOSTAT. (2016). Producción de cultivos [en línea]. [Consulta: 25 març 2021]. Recuperat de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Food and Agriculture of the United Nations, FAOSTAT. (2019). Datos de cultivos [en línea]. [Consulta: 21 març 2021]. Recuperat de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

- Gerin D., Pollastro S., Raguseo C., De Miccolis Angelini R.M. and Faretra F. (2018). A Ready-to-Use Single and Duplex-TaqMan-qPCR Assay to Detect and Quantify the Biocontrol Agents *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii*. *Front. Microbiol.* 9:2073. doi: 10.3389/fmicb.2018.02073
- Ghahremani, Z., Escudero, N., Beltrán-Anadón, D., Saus, E., Cunquero, M., Anadilla, J., Loza-Alvarez, P., Gabaldón, T., i Sorribas, F. J. (2020). *Bacillus firmus* Strain I-1582, a Nematode Antagonist by Itself and Through the Plant. *Frontiers in Plant Science*. Recuperat de <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00796>
- Giné, A. (2016). Population dynamics of *Meloidogyne spp.* on tomato and cucumber and biologically based management strategies [en línia]. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Agroalimentaria i Biotecnología. Universidad Politècnica de Catalunya. [Consulta: 6 abril 2021]. Recuperat de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/106483/TAGB1de1.pdf>
- Giné, A., Escudero, N. i Sorribas, F.J. (2020). Control de enfermedades de plantas causadas por nematodos. Control de enfermedades de plantas. *Fitopatología* [en línia]. Sociedad Española de Fitopatología. [Consulta: 2 juliol 2021]. Recuperat de <https://sef.es/sites/default/files/publications/fitopatologiaSEFn5.pdf>
- Giné, A., i Sorribas, F. J. (2016). Effect of plant resistance and BioAct WG (*Purpureocillium lilacinum* strain 251) on *Meloidogyne incognita* in a tomato–cucumber rotation in a greenhouse. *Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.4357>
- Giné, A., i Sorribas, F. J. (2017). Quantitative approach for the early detection of selection for virulence of *Meloidogyne incognita* on resistant tomato in plastic greenhouses. *Plant Pathol.* 66, 1338–1344. doi: 10.1111/ppa.12679
- González, L. E. (2017). Implementación de un cultivo de sandía (*Citrullus lanatus*) como aporte al fortalecimiento de la cadena agrícola en el corregimiento La India, departamento de Santander [en línia]. Trabajo de final de grado. Ingeniería Agronómica. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de la Salle. [Consulta: 19 abril 2021] Recuperat de https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1015&context=ingenieria_agronomica
- Gortari, M. C., i Roque, A. H. (2016). *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876: Producción de conidias en cultivos sobre sustratos sólidos y evaluación de su actividad sobre *Nacobbus aberrans* en plantas de tomate. Facultad de Agronomía, La Plata.
- Grant, M. R., i Jones, J. D. G. (2009). *Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease*. <https://doi.org/10.1126/science.1173771>
- Greco, N., i Di Vito, M. (2009). “Population dynamics and damage level,” in *Root-knot Nematodes*, eds R. N. Perry, M. Moens, and J. L. Starr (Wallingford: CABI international), 246–274. doi: 10.1079/9781845934927.0246

- Herrera-Parra, E., Cristóbal-Alejo, J., i Ramos-Zapata, J. A. (2017). *Cepas de Trichoderma como promotoras del crecimiento en Capsicum annuum y como agentes de biocontrol en Meloidogyne incognita*. Revista Chilena de Investigaciones Agropecuarias. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000400318>
- Horticultura. (2018). *Flores* [en línia]. [Consulta: 9 març 2021]. Recuperat de <https://www.flores.ninja/horticultura/>
- Humphrey, L. (2017). Manual de manejo agronómico para cultivo de sandía [en línia]. Instituto Nacional de Investigación i Tecnología Agraria i Alimentaria. [Consulta: 16 març 2021] Recuperat de <https://www.inia.cl/wp-content/uploads/ManualesdeProduccion/02%20Manual%20Sandia.pdf>
- Hussey, R., i Barker, K. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique. *Biology* [en línia]. Plant disease reporter. [Consulta: 17 maig 2021]. Recuperat de <https://www.semanticscholar.org/paper/A-comparison-of-methods-of-collecting-inocula-of-a-Hussey-Barker/e40d4ee143a2d4464b33554c3092078c0ef8bf38>
- Kiewnick, S., i Sikora, R. A. (2006). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.12.006>
- Lamovsek, J., Urek, G., i Trdan, S. (2013). Biological Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne spp.*): *Microbes against the Pests* [en línia]. [Consulta: 19 abril 2021] Recuperat de <http://aas.bf.uni-lj.si/september2013/10Lamovsek.pdf>
- Larín, M.A, Díaz, L.A., i Flor de Serrano, R. (2018). Cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA). *Guía técnica del cultivo de tomate* [en línia]. [Consulta: 20 abril 2021] Recuperat de http://centa.gob.sv/docs/guias/hortalizas/Guia%20Centa_Tomate%202019.pdf
- López-Gómez, M. F. (2015). *Meloidogyne* species in cucurbit crops. Characterization and quantification of the host-parasite relationship [en línia]. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Agroalimentaria i Biotecnología. Universidad Politécnica de Cataluña. [Consulta: 21 març 2021]. Recuperat de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/95762/TMFLG1%20de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- López-Gómez, M., Gine, A., Vela, M. D., Ornat, C., Sorribas, F. J., Talavera, M., & Verdejo-Lucas, S. (2014). Damage functions and thermal requirements of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* on watermelon. *Annals of Applied Biology*, 165(3), 466–473. doi:10.1111/aab.12154

- López-Llorca, L. V., Gómez-Vidal, S., Monfort, E., Larriba, E., Casado-Vela, J., Elortza, F., ... Martín-Nieto, J. (2010). Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genetics and Biology*, 47(4), 342–351. doi:10.1016/j.fgb.2010.01.004
- Martínez-Medina, A., Fernández, 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*. <https://doi.org/10.1111/nph.14251>
- Mendis, H.C., Thomas, V.P., Schwientek, P., Salamzade, R., Chien J-T., Waidyaratne P., Kloepper, J. I De la Fuente, L. (2018). Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLoS ONE* 13(2): e0193119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193119>
- Mingunova, V. D., i Sasanelli, N. (2021). Bacteria as Biocontrol Tool against Phytoparasitic Nematodes. *Plants*. <https://doi.org/10.3390/plants10020389>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA. (2018). *Frutas y hortalizas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA. Gobierno de España. Recuperat de https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/frutas-y-hortalizas/informacion_general.aspx
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA. (2016). *Resolución de la dirección general de sanidad de la producción agraria. T34 Biocontrol*. Recuperat de <https://www.mapa.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/ES-00283.pdf>
- Mitkowski, N. A., i Abawi, G. S. (2003). *Nematodos agalladores*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2003-0917-01>
- Nieto Vilaró, Roger (2020). Efecte combinat de la resistència vegetal conferida per gens R i de la induïda per *Trichoderma* sobre *Meloidogyne* en albergínia i síndria. Treball de final de grau. Grau en Enginyeria de Sistemes Biològics. Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona (EEABB). Universitat Politècnica de Catalunya.
- Omweaga, C. O., Thomason, I. J., i Roberts, P. A. (1988). A Nondestructive Technique for Screening Bean Germ Plasm for Resistance to *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease*.
- Ornat, C. i Sorribas, F.J. (2008). Integrated Management of root-knot nematodes in Mediterranean Horticultural Crops. *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*, 2008, Volume 2. ISBN : 978-1-4020-6062-5

- Ornat, C. i Sorribas, F.J. (2011). Estrategias de control integrado de nematodos fitoparásitos. Andrés-Yeves, M. F., i Verdejo-Lucas, S. (2011). *Enfermedades causadas por nematodos fitoparásitos en España* (Vol. 2). Phytoma-España [en línia]. [Consulta: 1 juliol 2021] Recuperat de <https://www.phytoma.com/tienda/libros/product/enfermedades-causadas-por-nematodos-fitoparasitos-en-espana>
- Orrala, N., Herrera, L., Arzube, M., i Pozo, L. (2016). Effect of biological nematicides and the rootstock on watermelon (*Citrullus lanatus* L.) production in Ecuador. *Centro agrícola* [en línia]. [Consulta: 17 juny 2021]. Recuperat de <http://oaji.net/articles/2017/2674-1489589253.pdf>
- Perdomo, H., Cano, J., Gené, J., García, D., Hernández-Restrepo, M., i Guarro, J. (2012). Polyphasic analysis of *Purpureocillium lilacinum* isolates from different origins and proposal of the new species *Purpureocillium lavendulum*. <https://doi.org/10.3852/11-190>
- Pieterse, CM, Zamioudis, C., Berendsen, RL, Weller, DM, Van Wees, SCM i Bakker, AHM (2014). Resistencia sistémica inducida por microbios beneficiosos. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. doi: 10.1146 / annurev-phyto-082712-102340
- Pocurull, M., Fullana, A. M., Ferro, M., Valero, P., Escudero, N., Saus, E., Gabaldón, T., i Sorribas, F. J. (2020). Commercial Formulates of *Trichoderma* Induce Systemic Plant Resistance to *Meloidogyne incognita* in Tomato and the Effect Is Additive to That of the Mi-1.2 Resistance Gene. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03042>
- PrivatewaterhouseCoopers (PwC). (2019). El futuro del sector agrícola español [en línia]. [Consulta: 1 abril 2021]. Recuperat de <https://www.pwc.es/es/publicaciones/assets/informe-sector-agricola-espanol.pdf>
- Ravichandra, N. G. (2014). *Horticultural Nematology*. Springer Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1841-8>
- Requena, A. M. (2013). Control Biológico de *Meloidogyne incognita* en Pimiento (*Capsicum annuum*) [en línia]. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena. [Consulta: 23 abril 2021] Recuperat de <https://pdfs.semanticscholar.org/3d2b/cb4fc0b168620039b0962cdb538ffdb0162b.pdf>
- Rojas, L. A. (2017). Control biológico del nematodo agallador del tomate (*Solanum lycopersicum* L) utilizando hongos nematófagos en condiciones de campo [en línia]. Tesis fin de grado. Ingeniería Agrónoma. Facultad Agropecuaria y de recursos naturales renovables. Universidad Nacional de Loja. [Consulta: 17 abri 2021]. Recuperat de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/19236/1/LIVIA%20ANABEL%20ROJAS%20VIVANCO.pdf>
- Rubio, V., i Fereres, A. (2005). Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos [en línia]. [Consulta: 19 abril 2021] Recuperat de <https://core.ac.uk/download/pdf/36025273.pdf>

- Talavera, M., i Verdejo-Lucas, S. (2015). Estrategias para la Gestión Integrada de Nematodos en Horticultura Protegida [en línea]. [Consulta: 26 març 2021]]. Recuperat de https://www.researchgate.net/publication/322386789_Estrategias_para_la_Gestion_Integrada_de_Nematodos_en_Horticultura_Protegida
- Talavera, M., Verdejo-Lucas, S., Ornat, C., Torres, J., Vela, M. D., Macias, F. J., Cortada, L., Arias, D. J., Valero, J., i Sorribas, F. J. (2009). Crop rotations with Mi gene resistant and susceptible tomato cultivars for management of root-knot nematodes in plastic houses. *Crop protection*. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.03.015>
- Terefe, M., Tefera, T., i Sakhuja, P. K. (2008). Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. *Journal of Invertebrate Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.11.004>
- Tiraferri, S. R., Arcangeli, G., Boebel, A., Gollo, M., Gualco, A., Ramella, S., i Cantoni, A. (2012). Flocter® (*Bacillus firmus* I-1582): nuovo nematocida biologico per il controllo delle principali specie di nematodi parassiti dannosi alle colture orticole. *Giornate Fitopatologiche*.
- Vinces, E. L. (2019). *Selección de aislados nativos de Purpureocillium lilacinum spp y materiales orgánicos en el control del nematodo Meloidogyne incognita (Kofoid & White) Chitwood en tomate*. Tesis de final de grado. Ingeniería agrónoma. Facultad agropecuaria y de recursos naturales renovables. Universidad Nacional de Loja. Recuperat de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21660/1/EDITA%20LUCIA%20VINCES%20VIDAL.pdf>
- Wilson, M., i Jackson, T. A. (2013). Progress in the commercialisation of bionematicides. *BioControl*, 58(6), 715–722. doi:10.1007/s10526-013-9511-5
- Xing, L., i Westphal, A. (2012). Predicting Damage of *Meloidogyne incognita* on Watermelon. *Journal of Nematology* [en línea] 44(2):127–133. [Consulta: 14 juny 2021]. Recuperat de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3578463/pdf/127.pdf>
- Zamora-Gómez, L. L., i Loredó-Treviño, A. (2020). Importancia del Melón (*Cucumis melo*) y Técnicas para su Conservación. *Journal of BioProcess and Chemical* [en línea] vol.14, no.24. [Consulta: 6 maig 2021]. Recuperat de <http://www.biochemtech.uadec.mx/Articulos/No.24/1%20JBCT-2020-001.pdf>

Annexos

Annex A: Concentració de l'inòcul i la seva viabilitat

· *Bacillus firmus* soca I-1582

La concentració de *Bacillus firmus* amb què es va inocular va ser obtinguda de l'experiment de **Ghahremani et al. (2020)** que va ser de 10^9 UFC/planta.

· *Purpureocillium lilacinum* soca 251

La quantitat recomanada de PL a afegir per hectàrea als cultius de tomàquet, pebrot, síndria i meló són 0,75 L (**BioAct Prime, s. f.**). A partir d'això, de la densitat d'aquest, $1'08 \text{ g/cm}^3$ (**Bayer CropScience, 2021**) i la concentració de microorganisme que conté el format (4,7·10¹⁰ UFC/g), podem determinar la concentració necessària a afegir, tal com es mostra a continuació:

$$\frac{0,75 \text{ L}}{\text{ha}} \cdot \frac{1000 \text{ cm}^3}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1 \text{ ha}}{10^{10} \text{ cm}^3} \cdot \frac{200 \text{ cm}^3 \text{ sorra}}{\text{planta}} \cdot \frac{1,08 \text{ g}}{\text{cm}^3} \cdot \frac{4,7 \cdot 10^{10} \text{ UFC}}{\text{g}} = \frac{7,6 \cdot 10^5 \text{ UFC}}{\text{planta}}$$

· *Trichoderma asperellum* soca T34

La dosi que es va aplicar va ser la recomanada pel fabricant, 10g/1000 L (**T34 Biocontrol, 2021**). Tenint en consideració els volums dels pots on realitzem l'experiment i la concentració que conté el format comercial emprat, vam arribar a la quantitat que vàrem posar per planta:

$$\frac{0,01 \text{ g}}{\text{L}} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ cm}^3} \cdot \frac{200 \text{ cm}^3 \text{ sorra}}{\text{planta}} \cdot \frac{10^{12} \text{ UFC}}{\text{Kg}} \cdot \frac{1 \text{ Kg}}{1000 \text{ g}} = \frac{2 \cdot 10^6 \text{ UFC}}{\text{planta}}$$

Per tal d'avaluar la viabilitat es varen sembrar 200 UFC de cada microorganisme repartides en tres plaques del medi de cultiu apte per al creixement de cadascun, concretament BF en Plate Count Agar (PCA) i PL i T34 en Potato Dextrose Agar (PDA). El procediment es va dur a terme en condicions estèrils a la cambra de flux laminar on, sempre prop de la flama, la suspensió de microorganismes es va distribuir de manera uniforme a les plaques amb l'utensili de sembra evitant la formació de

bombolles. Posteriorment, les plaques foren segellades amb parafilm i emmagatzemades a temperatures de 35 °C en el cas de BF i 25 °C per PL i T34. Finalment, es va fer un recompte del número de colònies a les 48h i 72h, d'on es va obtenir l'eficiència, excepte en el cas de BF que només es va realitzar a les 72h.

Taula 4. Eficiència de cada microorganisme a les 48h i 72h després de la sembra.

Microorganisme	Eficiència (%)	
	48h	72h
BF	-	92
PL	64,5	>100
T34	63,3	82,5

A més de mirar l'eficiència amb el número de colònies, per tal d'assegurar que les quantitats de cada microorganisme eren correctes, es va dur a terme un recompte dels conidis a la placa de Neubauer que varen confirmar que estàvem en les concentracions adequades.

Annex B: Resultats del pes, recompte de masses i ous i determinació de la fertilitat.

Taula 5. Resultats obtinguts en pebrot cv. Tinsena.

Tractament	Repetició	Pes (g)	Infectivitat (nº masses)	Reproducció (nº ous)	Fertilitat (nº ous / nº masses)
Control	1	0,818	1	700	700,00
	2	0,742	2	800	400,00
	3	0,631	5	1176	235,20
	4	0,831	0	0	-
	5	0,960	1	810	810,00
	6	0,686	2	609	304,50
	7	0,999	1	145	145,00
	8	0,740	0	0	-
	9	1,200	1	168	168,00
	10	0,482	4	250	62,50
	11	0,894	2	320	160,00
	12	1,336	2	50	25,00
	13	1,082	6	2254	375,67
	14	0,776	2	792	396,00
	15	0,800	7	2162	308,86
	PL	1	1,582	5	1365
2		1,607	4	920	230,00
3		1,637	1	25	25,00
4		0,924	8	1232	154,00
5		1,637	3	1375	458,33
6		1,128	2	650	325,00
7		1,477	3	891	297,00
8		0,534	3	231	77,00
9		0,691	3	1080	360,00
10		0,541	1	224	224,00
11		1,343	5	990	198,00
12		1,500	2	459	229,50
13		0,900	3	153	51,00
14		1,220	8	1248	156,00
15		1,218	2	455	227,50
16		0,786	1	152	152,00

T34	1	2,238	9	1296	144,00
	2	0,760	6	1224	204,00
	3	1,892	3	1533	511,00
	4	0,669	5	2108	421,60
	5	1,743	2	864	432,00
	6	0,990	4	1232	308,00
	7	1,502	1	780	780,00
	8	2,799	3	1269	423,00
	9	2,451	3	2622	874,00
	10	2,789	3	1650	550,00
	11	2,463	7	4280	611,43
	12	0,711	5	2071	414,20
	13	1,851	5	2200	440,00
	14	2,520	8	2831	353,88
	15	1,752	2	861	430,50
	16	2,009	2	529	264,50
BF	1	2,080	3	714	238,00
	2	1,452	0	0	-
	3	1,085	1	0	0,00
	4	0,445	0	0	-
	5	1,094	1	304	304,00
	6	1,410	1	324	324,00
	7	1,206	1	96	96,00
	8	1,322	1	234	234,00
	9	0,907	0	0	-
	10	0,661	0	0	-
	11	1,033	4	368	92,00
	12	1,267	2	450	225,00
	13	0,968	1	234	234,00
	14	0,574	1	384	384,00
	15	1,032	3	770	256,67
	16	0,898	2	651	325,50

Taula 6. Resultats obtinguts en tomàquet cv. Durinta.

Tractament	Repetició	Pes (g)	Infectivitat (nº masses)	Reproducció (nº ous)	Fertilitat (nº ous / nº masses)
Control	1	0,567	52	26303	505,83
	2	0,71	66	26810	406,21
	3	0,588	56	26496	473,14
	4	0,783	70	33540	479,14
	5	1,164	102	6951	68,15
	6	0,98	71	30250	426,06
	7	0,751	49	22320	455,51
	8	1,435	59	25685	435,34
	9	0,815	68	31968	470,12
	10	0,942	84	22750	270,83
	11	1,385	52	3504	67,38
	12	1,181	87	35000	402,30
	13	0,852	62	30951	499,21
	14	0,733	74	20944	283,03
	15	0,823	79	39000	493,67
	16	0,6	83	21250	256,02
PL	1	0,483	75	9716	129,55
	2	0,618	70	22082	315,46
	3	0,594	66	24500	371,21
	4	0,56	75	23520	313,60
	5	0,592	66	28512	432,00
	6	0,837	85	27132	319,20
	7	0,715	71	31152	438,76
	8	0,539	86	27508	319,86
	9	0,306	43	21148	491,81
	10	0,839	82	23092	281,61
	11	0,43	50	14980	299,60
	12	0,564	73	17370	237,95
	13	0,49	83	34176	411,76
	14	0,543	44	11000	250,00
	15	0,541	58	23478	404,79
	16	0,774	57	17216	302,04
T34	1	0,462	59	30456	516,20
	2	0,45	78	23358	299,46
	3	0,679	70	37584	536,91

	4	0,554	75	28728	383,04
	5	0,628	81	31648	390,72
	6	0,342	62	24592	396,65
	7	0,814	69	32800	475,36
	8	0,635	82	34944	426,15
	9	0,523	65	34916	537,17
	10	0,666	92	40704	442,43
	11	0,755	94	40508	430,94
	12	0,801	64	21450	335,16
	13	0,498	75	36120	481,60
	14	0,733	72	29172	405,17
	15	0,63	90	40112	445,69
	16	0,563	76	18532	243,84
BF	1	0,201	18	4462	247,89
	2	0,323	21	3198	152,29
	3	0,372	13	3591	276,23
	4	0,418	25	5412	216,48
	5	0,379	10	2044	204,40
	6	0,262	9	792	88,00
	7	0,164	4	1932	483,00
	8	0,313	13	8380	644,62
	9	0,447	34	7287	214,32
	10	0,153	10	875	87,50
	11	0,346	23	4806	208,96
	12	0,183	5	851	170,20
	13	0,48	50	11110	222,20
	14	0,138	8	3450	431,25
	15	0,268	31	4600	148,39
	16	0,269	9	2496	277,33

Taula 7. Resultats obtinguts en Síndria cv. Sugar Baby.

Tractament	Repetició	Pes (g)	Infectivitat (nº masses)	Reproducció (nº ous)	Fertilitat (nº ous / nº masses)
Control	1	0,399	22	11775	535,23
	2	0,666	23	12012	522,26
	3	0,417	11	6634	603,09
	4	0,568	12	4960	413,33
	5	0,345	2	1728	864,00
	6	0,13	1	160	160,00
	7	0,568	8	5010	626,25
	8	0,28	4	2790	697,50
	9	0,306	30	16005	533,50
	10	0,532	30	20480	682,67
PL	1	0,406	10	6014	601,40
	2	0,313	12	4860	405,00
	3	0,209	4	3108	777,00
	4	0,283	10	8126	812,60
	5	0,452	7	4832	690,29
	6	0,064	1	280	280,00
	7	0,243	8	3886	485,75
	8	0,186	9	2842	315,78
	9	0,234	23	8680	377,39
	10	0,299	9	6968	774,22
	11	0,113	1	336	336,00
	12	0,287	14	5890	420,71
	13	0,329	10	8370	837,00
	14	0,125	1	1768	1768,00
T34	1	0,464	13	8640	664,62
	2	0,143	8	4216	527,00
	3	0,564	7	3840	548,57
	4	0,4	2	468	234,00
	5	0,499	5	2912	582,40
	6	0,461	4	3776	944,00
	7	0,763	6	6264	1044,00
	8	0,53	1	224	224,00
	9	0,701	7	4704	672,00
	10	0,613	6	4284	714,00
	11	0,603	9	4144	460,44
	12	0,531	5	3630	726,00
	13	0,215	7	1452	207,43

	14	0,415	3	832	277,33
BF	1	0,141	3	1276	425,33
	2	0,169	4	2352	588,00
	3	0,113	1	240	240,00

Taula 8. Resultats obtinguts en meló cv. Charentais.

Tractament	Repetició	Pes (g)	Infectivitat (nº masses)	Reproducció (nº ous)	Fertilitat (nº ous / nº masses)
Control	1	0,885	17	8064	474,35
	2	0,940	17	7504	441,41
	3	0,870	14	10416	744,00
	4	0,901	9	3944	438,22
	5	0,775	9	4200	466,67
	6	0,623	14	9120	651,43
	7	0,847	18	8284	460,22
	8	0,788	28	12690	453,21
	9	0,518	17	16642	978,94
	10	0,724	27	23868	884,00
PL	1	0,3	23	11739	510,39
	2	0,361	14	9108	650,57
	3	0,503	20	4214	210,70
	4	0,634	19	10504	552,84
	5	0,625	9	4108	456,44
	6	0,392	12	8160	680,00
	7	0,508	4	1216	304,00
	8	0,347	9	10412	1156,89
	9	0,497	16	5432	339,50
	10	0,424	11	8075	734,09
T34	1	0,932	5	3920	784,00
	2	0,771	9	10044	1116,00
	3	0,617	22	18486	840,27
	4	0,388	14	7280	520,00
	5	1,094	15	12582	838,80
	6	0,425	3	2448	816,00
	7	0,734	17	5750	338,24
	8	0,377	7	3978	568,29
	9	0,607	10	4452	445,20

	10	0,812	3	2304	768,00
BF	1	0,255	6	4048	674,67
	2	0,473	35	13600	388,57
	3	0,285	22	7460	339,09
	4	0,414	45	19602	435,60
	5	0,399	26	5376	206,77
	6	0,424	19	5984	314,95
	7	0,352	28	12738	454,93
	8	0,358	25	9504	380,16
	9	0,393	34	15930	468,53
	10	0,302	25	10720	428,80