



Contribution of molecular tools in the development of products based on antagonistic microorganisms, for the control of post-harvest diseases

Aporte de las herramientas moleculares en el desarrollo de productos basados en microorganismos antagonistas, para el control de enfermedades poscosecha

Soto-Muñoz, L.^{1,2}, Teixidó, N.³, Usall, J.³, Casals, C.³, Torres, R.³

¹Departament de Tecnologia d' Aliments. Universitat de Lleida, Agrotecnio Center. Campus ETSEA – Lleida, Catalunya, España. ²Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario S/N, Colonia Las Campanas, 76010 Querétaro, México. ³IRTA, Programa Postcosecha, Edifici Fruitcentre, Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida, Parc de Gardeny, 25003. Lleida, Catalunya, España.

Cite this paper/Como citar este artículo: Soto-Muñoz, L., Teixidó, N., Usall, J., Casals, C., Torres, R. (2020). Contribution of molecular tools in the development of products based on antagonistic microorganisms, for the control of post-harvest diseases *Revista Bio Ciencias* 7, e958. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e958>



ABSTRACT

Currently European legislation ((EU) No. 546/2011) requires a rigorous risk assessment before registering a biological fungicide as a postharvest plant protection product for fruit, and before placing it on the market. This evaluation should include information on the ability of the biological control agent (BCA) to colonize, persist and spread, as well as possible pathways of spread under normal conditions of use. Molecular methods based on the detection of nucleic acids by the polymerase chain reaction (PCR) technique can be of great help to researchers working on biological control. In this paper, briefly introduce the program for developing a BCA, and present examples of how molecular tools have been used to generate

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: February 19th 2020.

Accepted/Aceptado: October 21th 2020.

Available on line/Publicado: November 06th 2020.

*Corresponding Author:

Rosario Torres, IRTA, Programa Postcosecha, Edifici Fruitcentre, Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida, Parc de Gardeny, 25003. Lleida, Catalunya, España. Phone: (349) 73 03 2850 Fax: (34) 973238301. E-mail: rosario.torres@irta.cat, <http://www.irta.cat/es/centre/irta-fruitcentre/>

RESUMEN

En la actualidad, la normativa europea vigente ((EU) No 546/2011) exige una evaluación rigurosa de los riesgos antes de registrar un fungicida biológico como producto fitosanitario para poscosecha de fruta, y antes de su introducción en el mercado. Esta evaluación debe incluir información sobre la capacidad del agente de control biológico (BCA) para colonizar, persistir y propagarse, así como las posibles rutas de dispersión en condiciones habituales de uso. Los métodos moleculares basados en la detección de ácidos nucleicos por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden ser de gran ayuda para investigadores que trabajan en control biológico. En este trabajo, brevemente se introduce el programa de desarrollo de un BCA, y se presentan ejemplos de cómo las herramientas moleculares han sido utilizadas para generar información valiosa para el registro de un BCA efectivo contra patógenos de poscosecha de fruta.

PALABRAS CLAVE

Biocontrol, hongos fitopatógenos, marcadores moleculares, técnicas basadas en PCR.

valuable information for the registration of an effective BCA against post-harvest fruit pathogens.

KEY WORDS

Biocontrol, phytopathogenic fungi, molecular markers, PCR-based techniques.

Introduction

Currently, at a global level, there is a great interest from farmers, agricultural technicians and government agencies on the use of biological pest control, as a promising alternative to advance towards a more sustainable agriculture, capable of providing safer and more environmentally friendly agro-foods, which are characteristics demanded by the consumer.

This interest has been reflected by several research groups that have focused their work on discovering and studying the behavior of numerous biological control agents (BCAs) against the main post-harvest pathogens (Usall *et al.*, 2016). The use of microorganisms as BCAs under practical conditions can represent a great challenge, but also a great advantage, because room temperature and partially controlled humidity can affect to interactions between the fruit and the pathogen promoting the BCA or antagonistic activity (Liu *et al.*, 2013). Besides, combining BCAs with other alternative control methods against pathogens could help to overcome some limitations of the antagonistic activity (Droby *et al.*, 2019). On the other hand, for its successful commercialization, it is essential to carry out several studies that provide essential information for the registration and marketing of the product. To this purpose, DNA-based molecular technologies can be of great tool to researchers in biological control topics. In the present work, we show a brief introduction to the development program of a BCA, and examples of how molecular tools have been used to generate valuable information for the registration of an effective BCA against post-harvest pathogens.

Development of a bca-based product

Identification, development and commercialization of a biological product is a long and

Introducción

Hoy en día, a nivel mundial existe un gran interés por parte de los agricultores, técnicos agrícolas e instancias gubernamentales sobre el uso del control biológico de plagas, como una alternativa prometedora para avanzar hacia una agricultura más sostenible, capaz de brindar agro-alimentos inocuos y amigables con el medio ambiente, los cuales son altamente demandados por el consumidor. Este interés se ha visto reflejado, por varios grupos de investigación que han enfocado sus trabajos en descubrir y estudiar el comportamiento de numerosos agentes de control biológico (BCAs) frente a los principales patógenos de poscosecha (Usall *et al.*, 2016). El uso de microorganismos como BCAs en condiciones prácticas puede representar un gran desafío, pero también una gran ventaja, debido a que en poscosecha la temperatura y humedad, parcialmente controladas, puede afectar a las interacciones entre la fruta y el patógeno, a favor del BCA ó antagonista (Liu *et al.*, 2013). Además, la combinación de BCAs con otros métodos alternativos de control contra patógenos podría ayudar a superar algunas limitaciones de la actividad de los antagonistas (Droby *et al.*, 2019). Por otra parte, para que un BCA sea introducido con éxito en el mercado es indispensable realizar una serie de estudios que generen la información necesaria para el registro y comercialización del producto. Para ello, las tecnologías moleculares basadas en el DNA pueden ser de gran ayuda para los investigadores que trabajan en control biológico. En este trabajo, hacemos una breve introducción del programa de desarrollo de un BCA, y presentamos ejemplos de cómo las herramientas moleculares han sido utilizadas para generar información valiosa para el registro de un BCA efectivo contra patógenos de poscosecha.

Desarrollo de un producto a base de BCAs

La identificación, desarrollo y comercialización de un producto biológico es un proceso largo y costoso que involucra una serie de estudios y que podemos ver de forma esquemática en la Figura 1. Estos estudios proporcionan información de las características específicas del microorganismo antagonista, como son: (i) la estabilidad genética, (ii) la capacidad para colonizar la superficie de las frutas y persistir de forma efectiva en el fruto, (iii) la efectividad a bajas concentraciones, (iv) los bajos requerimientos nutricionales, y (v) la capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas del medio ambiente durante largo periodo de tiempo (Liu *et al.*, 2013). Además, se requiere de un amplio conocimiento de los

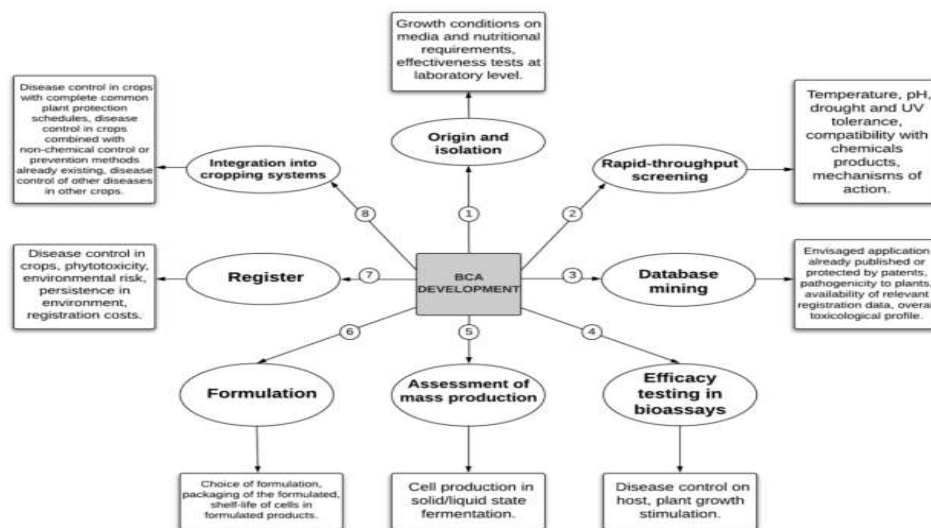


Figure 1. Steps for the development of a BCA for commercial use Adapted from Koehl et al. (2011).
Figura 1. Pasos para el desarrollo de un BCA para uso comercial. Adaptado de Koehl et al. (2011).

expensive process that involves a series of studies that are outlined in Figure 1. These studies provide information of the specific characteristics of the antagonistic, such as: (i) genetic stability, (ii) capacity to colonize fruit surface and persistence and effectiveness on fruit, (iii) effectiveness at low concentrations, (iv) low nutritional requirements, and (v) the ability to survive under adverse environmental conditions for a long period of time (Liu et al., 2013). In addition, a broad knowledge of the mechanisms of action of the antagonists is required, which have been understood with the development of technologies included in the general concept of 'omics' such as transcriptomics, proteomics and metabolomics (Massart et al., 2015).

In a BCA development program, the last stages are the most challenging, since the use of industrial equipment to scale-up production and/or formulation is required. In addition, assays needed to evaluate the environmental risk of the antagonist should have specific protocols. Moreover, it should be taken in account that the registration and regulation of BCAs (which we will discuss later) is a long and expensive process. Thus, to perform these studies, frequently the collaboration with a private company that wants to commercialize the biological control product is needed.

mecanismos de acción de los antagonistas, los cuales se han ido comprendiendo con el desarrollo de las tecnologías englobadas en el concepto general de las 'ómicas' tales como: la transcriptómica, proteómica y metabolómica (Massart et al., 2015).

De todo el programa del desarrollo de un BCA, las últimas etapas son las que presentan más desafíos en su realización, ya que es necesario el uso de equipos industriales para el escalado de la producción y/o la formulación. Además, el tipo de ensayos necesarios para evaluar el riesgo ambiental del antagonista carecen de protocolos definidos para su estudio. Esto sin dejar de considerar que el registro y la reglamentación de BCAs (de la cual hablaremos más adelante) es un proceso largo y costoso. Por tanto, para llevar a cabo estos estudios es frecuente la colaboración de los equipos de investigación con una empresa privada que desee comercializar el producto de control biológico. En México, son pocas instituciones que cuentan con la infraestructura necesaria para el desarrollo y escalado a nivel comercial de BCAs. El Instituto de Biotecnología de la UNAM y la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León han desarrollado productos de control biológico frente a fitopatógenos de pre- y poscosecha a nivel de formulación

In Mexico, few institutions possess the infrastructure necessary for the development and commercial scale of BCAs. The “Instituto de Biotecnología” of the “Universidad Nacional Autónoma de México” and the “Facultad de Ciencias” of the “Universidad Autónoma de Nuevo León” have developed biological control products against pre- and postharvest phytopathogens at a commercial or semi-commercial scale (Galindo *et al.*, 2015). Additionally, other institutions as the “Colegio de Postgraduados”, the “Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)” at Culiacán, the “Universidad Autónoma de Chapingo” and the “Universidad Autónoma de Querétaro” have done studies on isolation, identification and antagonistic effectivity at laboratory or field level. Nevertheless, few have been focused on key aspects such as formulation and production at a pilot level (Aguirre-Guitron *et al.*, 2018).

Worldwide, there are few products being marketed for the control of post-harvest fungal diseases of fruit. Among the BCA-based products that are on the market, or at some point have been commercialized are: BioSave® (*Pseudomonas syringae*), commercialized in the USA for application in fruit crops; Aspire® (*Candida oleophila*,

comercial o semi-comercial (Galindo *et al.*, 2015). Además, otras instituciones como el Colegio de Postgraduados, el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Culiacán, la Universidad Autónoma de Chapingo y la Universidad Autónoma de Querétaro han realizado estudios de aislamiento, identificación y efectividad antagonista a nivel de laboratorio o de campo; sin embargo, poco se ha hecho en aspectos claves como formulación y producción a nivel piloto (Aguirre-Guitron *et al.*, 2018).

A nivel mundial, existen muy pocos productos que se estén comercializando para el control de enfermedades fúngicas de poscosecha de fruta. Entre los productos a base de BCAs que se encuentran en el mercado, o bien, que en algún momento se han comercializado encontramos: BioSave™ (*Pseudomonas syringae*,) comercializado en EE UU para aplicación en cultivos frutales; Aspire (*Candida oleophila*, Ecogen, Langhorne, EE UU.), Yieldplus (*Candida albidus*, Sudáfrica) este producto se comercializó durante más de 15 años, pero fue retirado del mercado, al igual que BioSave™ y Aspire (Figura 2). El producto Avogreen (*Bacillus subtilis*, Sudáfrica) se introdujo en Sudáfrica para el control de cercospora en aguacate, pero no alcanzó el éxito comercial debido a resultados inconsistentes; Candifruit (*Candida*

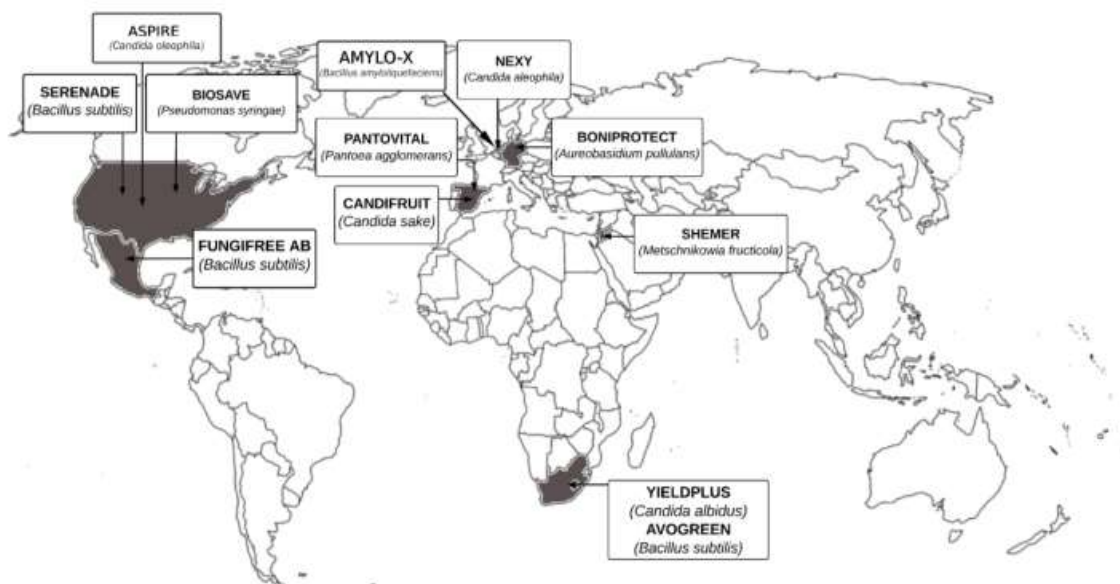


Figure 2. Global overview of BCA products developed for the control of fungal diseases in postharvest fruit.
Figura 2. Panorama mundial de los productos a base de BCAs desarrollados para el control de enfermedades fúngicas en poscosecha de fruta.

Ecogen, Langhorne, USA), Yieldplus® (*Candida albida*, South Africa) this product was commercialized for more than 15 years, but was withdrawn from the market, as well as BioSave® and Aspire® (Figure 2). The product Avogreen® (*Bacillus subtilis*, South Africa) was introduced in South Africa for the control of cercospora in avocado, but did not achieve commercial success due to inconsistent results; Candifruit® (*Candida sake*, Spain) is currently out of the market and with exploitation rights for the Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA). Pantovital® (*Pantoea agglomerans*, Spain) is a product that has been formulated and fully developed but never commercialized.

In 2013, Nexy® (*C. oleophila*, BioNext, Belgium) received EU-wide registration approval. Likewise, the following products are also registered: Serenade® (*B. subtilis*, Bayer CropScience, USA); BoniProtect® (*Aureobasidium pullulans*, Bio-Ferm, Tulln, Austria), AMYLO-X® (*Bacillus amyloliquefaciens*, Agriscience International, Belgium), and Shemer® based on *Metschnikowia fructicola*, marketed by Bayer Crop Science and sublicensed to Koppert (Droby et al, 2016). In Mexico, the only product developed is Fungifree AB® (*B. subtilis*, FMC Agroquímica de México). This product is already registered for anthracnose control in mango, papaya, avocado, and citrus (Galindo et al., 2015). In general, BCA-based products for postharvest applications continue to have a limited market and often have short shelf-life period; thus, improving storage period will be one of the most important challenges in the near future.

To perform all these studies and develop a antagonist-based product, one of the most important step is to develop methods that allow to detect and quantify the target microorganism (considered as the active ingredient) during the development process, using methods as a part of quality control, required for formulation process and, moreover, are necessary for registration (Droby et al., 2019). These methods are also applicable to the search of new isolates as well as on studies of the environment persistence of the antagonist.

Methods of detection and quantification of BCAs

Large amounts of detection and quantification methods have been developed for tracking and

sake, España) actualmente se encuentra fuera del mercado y con los derechos de explotación en manos del Instituto de Investigación y Tecnologías Agroalimentarias (IRTA). Pantovital (*Pantoea agglomerans*, España) es un producto que ha sido formulado y completamente desarrollado no comercializado.

En 2013, Nexy (*C. oleophila*, BioNext, Bélgica) recibió la aprobación del registro en toda la Unión Europea. Así mismo los siguientes productos también están registrados: Serenade® (*B. subtilis*, Bayer CropScience, EE. UU.); BoniProtect® (*Aureobasidium pullulans*, Bio-Ferm, Tulln, Austria), AMYLO-X® (*Bacillus amyloliquefaciens*, Agriscience International, Belgium), y Shemer® a base de *Metschnikowia fructicola*, comercializado por Bayer Crop Science y sublicenciado a Koppert (Droby et al., 2016). En México, el único producto desarrollado es Fungifree AB® (*B. subtilis*, FMC Agroquímica de México). Actualmente este producto está registrado para el control de antracnosis en mango, papaya, aguacate y cítricos (Galindo et al., 2015). En general, los productos a base de BCAs para su aplicación en poscosecha siguen luchando con mercados limitados y; además, suelen presentar una vida de anaquel corta, por lo que adaptar las condiciones de almacenamiento será uno de los retos más importantes en el futuro inmediato.

Para llevar a cabo todos los estudios que se requieren para el desarrollo de un producto biológico a base de microorganismos, es de suma importancia contar con metodologías que permitan la detección y cuantificación específica del microorganismo (ingrediente activo) en los diferentes puntos del proceso, en metodologías que conforman parte del control de calidad y que son requeridas para los estudios de formulación e indispensables para el proceso de registro (Droby et al., 2019). Estas metodologías también son aplicables para la búsqueda de nuevos aislamientos, así como en estudios de persistencia del antagonista en su entorno de aplicación.

Métodos de detección y cuantificación de BCAs

Un gran número de métodos de detección y cuantificación han sido desarrollados para el seguimiento y monitorización de microorganismos. La elección del método está determinada por el nivel de especificidad que exige el estudio. En el caso de los BCAs, la detección específica a nivel de cepa es muy importante, debido a que cuando se aplican ya sea en pre o poscosecha, son liberados al ambiente donde la comunidad microbiana

monitoring microorganisms. Selection of the method is based on the level of specificity required for the study. In the case of BCAs, strain-specific detection is essential, because when applied either pre- or post-harvest, BCAs are released into the environment where the microbial community is extremely complex, and other strains of the same species of the BCAs may be present.

Despite the variety of detection methods described in the literature for the study of microorganisms that are found in nature, those that have been used to monitor BCAs are: i) direct, ii) microbiological and iii) molecular methods.

The direct methods of quantification of microorganisms

Allow determinate the total population of microorganisms present in a sample, without the growth of microorganisms. Between these methods, turbidimetry has been identified as a useful tool to know the effect of environmental factors on the development and growth of *C. sake* CPA-1 a BCA formulated in a liquid and dry way (Carbó *et al.*, 2018). This type of study was carried out automatically using on equipment as the Bioscreen C that is fast and reproducible. Previously, however, the optimization of culture medium, agitation, and inoculum concentration is required for each microorganism.

Microbiological methods

Also known as culture-based or classical methods, have been generally used by most researchers for the monitoring of BCAs (Vilaplana *et al.*, 2020), due to is a simple and economic technique. One of the advantages of this technique is the quantification of viable cells. Instead, it has disadvantages such as: (i) that it does not detect the damaged cells that are metabolically active, but non-culturable (viable but nonculturable cell state [VBNC]), and (ii) it does not allow to discriminate the BCA from other strains with similar phenotype (Massart *et al.*, 2015).

For these reasons, this technique is not entirely suitable for monitoring, persistence and environmental impact studies of BCAs. For all these disadvantages, many studies are focused on highly specific and trustable methods using molecular methodologies, which we will discuss in the following section through.

es sumamente compleja, y pueden estar presentes otras cepas de la misma especie del BCA aplicado.

A pesar de la gran variedad de métodos de detección descritos en la literatura para el estudio de microorganismos en la naturaleza, los que han sido utilizados para monitorizar BCAs, son los métodos directos, microbiológicos y moleculares.

Los métodos directos de cuantificación de microorganismos

Permiten establecer la población total de microorganismos existentes en la muestra, sin necesidad de cultivar al microorganismo. Entre estos métodos, la turbidimetría y el conteo en microscopio con ayuda de la cámara de Neubauer se han llegado a utilizar como herramientas útiles para identificar el impacto de los factores medioambientales sobre el desarrollo y crecimiento del BCA *C. sake* CPA-1 formulada de manera líquida y seca (Carbó *et al.*, 2018). La turbidimetría se puede realizar de manera automatizada en equipos como el Bioscreen C, que tienen la ventaja de ser rápidos y reproducibles. Aunque es necesario optimizar tanto el medio cultivo, la agitación y el tamaño de inóculo para cada microorganismo de interés.

Los métodos microbiológicos

También conocidos como métodos basados en cultivos o clásicos. Han sido utilizados habitualmente por la mayoría de investigadores para el seguimiento de BCAs (Vilaplana *et al.*, 2020), por ser una técnica fácil y económica de realizar. Una de las ventajas de esta técnica es que cuantifica las células viables. En cambio, tiene como desventajas: (i) que no detecta las células dañadas que son metabólicamente activas, pero no cultivables (en estado viable pero no cultivable (VBNC del inglés: viable but non-culturable)), y (ii) no permite discriminar al BCA de otras cepas con el mismo fenotipo (Massart *et al.*, 2015).

Por lo que esta técnica no es del todo adecuada para la realización de estudios de seguimiento, persistencia e impacto ambiental de los BCAs. Por estas desventajas es que se está recurriendo, cada vez más, al uso de métodos altamente específicos y fiables, como son los moleculares, de los que abordaremos con más detalle en el siguiente apartado.

Métodos moleculares

Las técnicas moleculares para la identificación de BCAs están teniendo un auge muy importante debido a: (i) la alta especificidad que presentan, ya que pueden

Molecular methods

Molecular techniques for BCAs identification are increasing their use due to: (i) their high specificity, since they can detect only both the target molecule or microorganism; (ii) their sensitivity, since they can detect the presence of a specific microorganism; and (iii) give us results in less than 24 hours. Additionally, the use of molecular techniques allows the study of microbial populations without isolations, thus avoiding the disadvantages of microbial culture methods (Martini et al., 2015).

There is a variety of molecular techniques proposed to detect microorganisms of interest in different areas. Nevertheless, in this review we will focus only on molecular methods based on the detection of nucleic acids by the Polymerase Chain Reaction (PCR).

Specific DNA-based techniques are based on the amplification of gene sequences by PCR or through DNA digestion with restriction enzymes (RFLP). PCR technique has provided a set of markers, such as: Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPDs), Repetitive Extragenic Palindromic (REP), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), Selective Amplifications of Microsatellite Polymorphic Loci (SAMPLs), Direct Amplification with Microsatellite DNA (DAMD), among others (Sचना et al., 2013). AFLPs have been applied to monitor antagonistic microorganisms such as *Rhodotorula glutinis*, *Candida laurentii*, *A. pullulans* in the field and cold storage conditions (Lima et al., 2003). They have also been developed for differentiation of the antagonist *Metschnikowia pulcherrima* (Spadaro et al., 2008). In all cases, these types of markers are highly reproducible, but their analysis is quite laborious and costly. On the contrary, design of a molecular marker based on Specific-Characterized-Amplified-Region (SCAR), can lead to a reproducible amplification of a unique and specific DNA fragment that allows discriminate the strain of interest among others (Sचना et al., 2002).

SCARs have been used for detection of some BCAs, such as: *A. pullulans* L47 (Sचना et al., 2002), *Pichia anomala* strain K (De Clercq et al., 2003), *B. subtilis* BD170 (Broggini et al., 2005), *Pseudomonas*

detectar sólo la molécula o microorganismo de interés; (ii) su sensibilidad, al ser capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo; y (iii) su rapidez para obtener resultados en menos de 24 h. Además, el uso de técnicas moleculares permite estudiar las poblaciones microbianas sin hacer aislamientos, por tanto, se evitan los sesgos que pueden surgir con el método basado en el cultivo de microorganismos (Martini et al., 2015).

Existe una amplia variedad de técnicas moleculares que se han propuesto para la detección de microorganismos de interés en diferentes áreas. Sin embargo, en esta revisión nos centraremos únicamente en los métodos moleculares basados en la detección de los ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés: *polymerase chain reaction*).

Las técnicas específicas basadas en el DNA se fundamentan en la amplificación de secuencias de genes mediante la PCR ó mediante medios de digestión de DNA con enzimas de restricción (RFLP). La técnica PCR ha suministrado un conjunto de marcadores, tales como: DNA polimórfico amplificado al azar (RAPDs), palindrómico extragenómico repetitivo (REP), consenso intergénico repetitivo interbacteriano (ERIC), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), amplificación selectiva de loci polimórfico de microsatélites (SAMPL), amplificación directa con DNA microsatélites (DAMD), entre otros (Sचना et al., 2013). Los AFLP han sido aplicados para el seguimiento de microorganismos antagonistas, tales como *Rhodotorula glutinis*, *Candida laurentii*, *A. pullulans* tanto en campo como en condiciones de almacenamiento en frío (Lima et al., 2003). Los AFLPs también se han desarrollado para la diferenciación de aislados del antagonista *Metschnikowia pulcherrima* (Spadaro et al., 2008). En todos los casos, este tipo de marcadores han mostrado ser altamente reproducibles, pero su análisis es muy laborioso y costoso. Por el contrario, el diseño de un marcador molecular basado en regiones amplificadas caracterizadas por secuencia (SCAR del inglés: *specific-characterized-amplified-region*), dan lugar a una amplificación reproducible de un fragmento único y específico de DNA, que permite la diferenciación de la cepa diana de otras cepas (Sचना et al., 2002).

Los SCARs han sido utilizados para el marcaje de algunos BCAs, tales como: *A. pullulans* L47 (Sचना et al., 2002), *Pichia anomala* cepa K (De Clercq et al., 2003), *B. subtilis* BD170 (Broggini et al., 2005), *Pseudomonas fluorescens*

fluorescens EP62e (Pujol *et al.*, 2005), *P. agglomerans* CPA-2 (Nunes *et al.*, 2008), *C. oleophila* O (Massart *et al.*, 2015), *Penicillium oxalicum* 212 (Larena & Melgarejo, 2009), *Pseudomonas brassicacearum* (Holmberg *et al.*, 2009), *Bacillus cereus* strain TS02 (Chen *et al.*, 2010), and *B. amyloliquefaciens* CPA-8 (Gotor-Vila *et al.*, 2016).

The importance of developing a SCAR marker for a BCA is that allows, from the sequence to design specific primers to be used in a simple amplification by conventional PCR. One of the advantages of conventional PCR is its high specificity and sensitivity to detect microorganisms; therefore, it is a useful tool for the detection of BCAs (Schena *et al.*, 2013). In this sense, conventional PCR has been a key tool to evaluate the persistence and adaptation of the BCAs *P. agglomerans* CPA-2 and *B. amyloliquefaciens* CPA-8 in the field and under postharvest conditions in orange and peach, respectively (Soto-Muñoz *et al.*, 2015ab, Gotor-Vila *et al.*, 2016). The generated data defined the correct moment of application and the dose of the antagonist to ensure the success of the treatment. However, conventional PCR does not allow a quantitative analysis, although this limitation can be overcome using a quantitative or real-time PCR (qPCR).

Real-time PCR (qPCR)

The main characteristic that defines a qPCR is the chance to obtain quantitative results, because the amplification products can be detected with fluorescent dyes or using specific fluorescent oligonucleotide probes that allow the detection of a target sequence without interference from primer dimers or non-specific PCR products (Schena *et al.*, 2013).

The qPCR has demonstrated its versatility and utility for several applications in different research areas, and specifically in the detection and quantification of antagonistic, although quite limited yet. This technique has been applied to distinguish different BCAs, which are listed in Table 1.

Several studies have shown a high correlation between qPCR and other microbiological methods (Massart *et al.*, 2015). Nevertheless, qPCR has overestimated the viable population of the antagonist, as with *P.*

EP62e (Pujol *et al.*, 2005), *P. agglomerans* CPA-2 (Nunes *et al.*, 2008), *C. oleophila* O (Massart *et al.*, 2015), *Penicillium oxalicum* 212 (Larena & Melgarejo, 2009), *Pseudomonas brassicacearum* (Holmberg *et al.*, 2009), *Bacillus cereus* cepa TS02 (Chen *et al.*, 2010) y *B. amyloliquefaciens* CPA-8 (Gotor-Vila *et al.*, 2016).

La importancia de desarrollar un marcador SCARs para un BCAs es que permite a partir de la secuencia diseñar cebadores específicos para ser utilizados en una amplificación simple mediante PCR convencional. Una de las ventajas de la PCR convencional es su alta especificidad y sensibilidad para detectar microorganismos, siendo una herramienta útil para la detección de BCAs (Schena *et al.*, 2013). En este sentido, la PCR convencional ha sido una herramienta clave para evaluar la persistencia y adaptación de los BCAs *P. agglomerans* CPA-2 y *B. amyloliquefaciens* CPA-8 en campo y en condiciones de poscosecha en naranja y melocotón, respectivamente (Soto-Muñoz *et al.*, 2015ab, Gotor-Vila *et al.*, 2016). La información generada permite determinar el momento de aplicación y ajustar la dosis del antagonista para asegurar el éxito del tratamiento. No obstante, la PCR convencional no permite llevar a cabo un análisis cuantitativo, pero esta limitación puede resolverse mediante el uso de la PCR cuantitativa o a tiempo real (qPCR).

PCR a tiempo real (qPCR)

La principal característica que define la qPCR es la posibilidad de obtener resultados cuantitativos. Debido a que los productos de amplificación pueden ser detectados con colorantes fluorescentes o bien, utilizando sondas de oligonucleótidos fluorescentes específicas que permiten la detección de una secuencia de interés sin interferencia de dímeros de cebadores o de productos de PCR no específicos (Schena *et al.*, 2013).

La qPCR ha demostrado su versatilidad y utilidad para una serie de aplicaciones en diferentes áreas de investigación, y concretamente en la detección y cuantificación de microorganismos antagonistas, aunque de una manera aún más limitada. Esta técnica se ha aplicado para distinguir diferentes BCAs, los cuales se enumeran en la Tabla 1.

Algunos de estos estudios han mostrado una alta correlación de la qPCR con los métodos microbiológicos (Massart *et al.*, 2015). Sin embargo, en otros estudios la qPCR ha sobreestimado la población viable del antagonista, como fue el caso de *P. fluorescens* EPS62e y

Table 1.
Antagonistic microorganisms which have been detected and quantified by qPCR.

Tabla 1.
Microorganismos antagonistas que han sido detectados y cuantificados por qPCR.

Microorganism type	Antagonist strain	Pathogen target	Host	Reference
Bacteria	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> D747 and <i>B. subtilis</i> QST713	<i>Botrytis cinerea</i>	grape- berries	Rotolo et al. (2016)
	<i>P. agglomerans</i> CPA-2	<i>Penicillium expansum</i>	apple fruit	Soto-Muñoz et al. (2014)
	<i>P. fluorescens</i> EPS62e	<i>Erwinia amylovora</i>	apple flowers and leaves	Pujol et al. (2006)
Yeast	<i>A. pullulans</i> L47	<i>B. cinerea</i> and <i>Monilinia laxa</i>	grapes and cherry fruit	Schena et al. (2002)
	<i>C. oleophila</i> O	<i>B. cinerea</i> and <i>P. expansum</i>	apple fruit	Massart et al. (2015)
Fungus	<i>Cystofilobasidium infirmominatum</i> (Cim)	<i>B. cinerea</i> , <i>Phialophora malorum</i> , <i>Mucor</i> sp, <i>P. expansum</i> y <i>Monilinia</i> ssp.	apple, pear and cherry fruit	Spotts et al. (2009)
	<i>Epicoccum nigrum</i> strain 282 (EN282)	<i>Monilinia</i> ssp.	peach fruit	Larena & Melgarejo, (2009)

fluorescens EPS62e and *P. agglomerans* CPA-2 (Pujol et al., 2006; Soto-Muñoz et al., 2014). In both studies, the overestimation was attributed to the presence of cells in the VBNC state and the integrity of the DNA after cell death. In the case of BCAs, it is important to detect the viable cells of the antagonists, because the efficiency to control disease depend on concentration of viable cells on suspension, and their survival on fruit surface.

A possible strategy to exclude the detection of dead cells can be addressed using RNA instead of DNA as the target molecule. The use of RNA requires a reverse transcription step to convert RNA to cDNA prior to performing qPCR (Schena et al., 2013). The main disadvantage of this technique is that mRNA is quite weak and its degradation can mean to false negatives. Furthermore, the quantification is related to the number of mRNA molecules, and, in many species, the level of expression of mRNA depends on the physiological state

P. agglomerans CPA-2 (Pujol et al., 2006; Soto-Muñoz et al., 2014). En estos estudios, la sobreestimación se atribuyó a la presencia de células en estado VBNC y a la integridad del DNA presente después de la muerte celular. En el caso de BCAs es importante detectar la presencia viable del antagonista, debido a que su eficacia para controlar la enfermedad está relacionada con la concentración de células viables en la suspensión del tratamiento, y de su supervivencia en la superficie de la fruta.

Una posible estrategia para excluir la detección de células muertas puede abordarse utilizando RNA en lugar de DNA como molécula diana. El uso de RNA requiere un paso de transcripción inversa para convertir el RNA en DNAC antes de ejecutar la qPCR (Schena et al., 2013). Y la principal desventaja de esta técnica es que el RNAm es muy lábil y su degradación puede originar falsos negativos. Además, la cuantificación está vinculada con el número de moléculas de RNAm y el nivel de expresión del RNAm en muchas especies depende del estado fisiológico de las células (por ejemplo, el estado de VBNC) y las condiciones ambientales, lo que podría dar lugar a una cuantificación imprecisa.

of cells (for example, low in VBNC) and environmental conditions, which could lead to inaccurate quantification.

During the last decade, another approach has been introduced that has allowed quantitatively discrimination between viable and non-viable microorganisms by the use of DNA intercalating dyes combined with qPCR. The main approach to distinguish between viable and damaged cells is through the evaluation of membrane integrity. DNA intercalating agents can easily penetrate cells that have damaged membranes, but are impermeable in viable cells with intact membranes (Nocker & Camper, 2009).

One of the first strategies used for the detection of viable cells called EMA-PCR was developed by Nogva *et al.* (2003). The EMA-PCR is based on the ability of the Ethidium Monoazide molecule (EMA) to penetrate cells through damaged cytoplasmic membranes. After photoactivation, the EMA molecule binds covalently to DNA rendering it inaccessible during the PCR reaction (EMA-PCR). However, the role of EMA as a discriminating agent of damaged bacteria has been questioned, considering that it can also penetrate intact cells of some bacterial species (Kobayashi *et al.*, 2009). For this reason, the use of another DNA intercalating agent, called propidium monoazide (PMA), has been proposed.

Durante la última década, se ha introducido otro enfoque que ha permitido diferenciar cuantitativamente entre microorganismos viables y no viables, mediante el empleo de agentes intercalantes de DNA combinados con la qPCR. El principal criterio para distinguir entre células viables y células dañadas de manera irreversible es la integridad de la membrana. Los agentes intercalantes de DNA tienen la capacidad de penetrar fácilmente en células que presentan daños en las membranas, pero son impermeables en células viables con membranas intactas (Nocker & Camper, 2009).

Una de las primeras estrategias utilizadas para la detección de células viables denominado EMA-PCR fue desarrollada por Nogva *et al.* (2003). La EMA-PCR, consiste en la capacidad de penetración de la molécula de monoazida de etidio (EMA) en las células a través de las membranas citoplasmáticas dañadas. Tras una fotoactivación, la molécula de EMA se une covalentemente al DNA quedando inaccesible durante la reacción de PCR (EMA-PCR). Sin embargo, el papel del EMA como agente discriminante de bacterias dañadas ha sido cuestionado, al considerar que también puede penetrar en células intactas de algunas especies bacterianas (Kobayashi *et al.*, 2009). Por este motivo, se ha propuesto la utilización de otro agente intercalante de DNA, llamado monoazida de propidio (PMA).

El PMA es el resultado de la adición de un grupo azida al yoduro de propidio (PI) que se utiliza satisfactoriamente en la

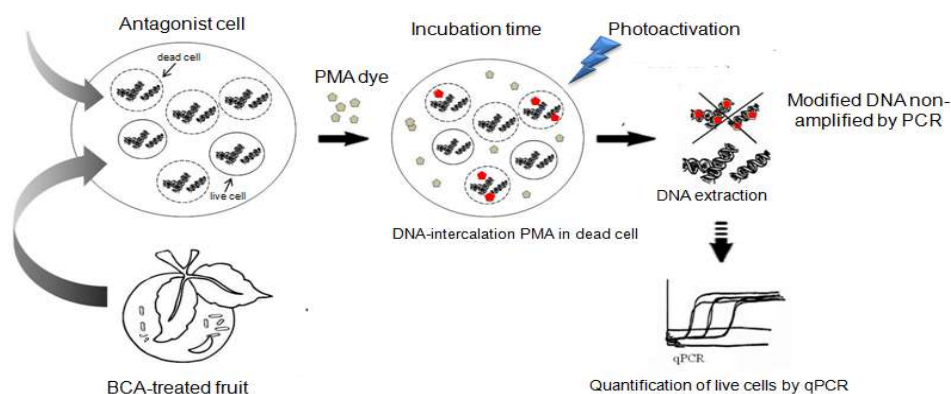


Figure 3. Mechanism of propidium monoazide (PMA) in combination with qPCR (PMA-qPCR) for the detection and quantification of viable cells of a BCA.

Figura 3. Mecanismo de monoazida de propidio (PMA) en combinación con la qPCR (PMA-qPCR) para la detección y cuantificación de células viables de un BCA.

PMA is the result of the addition of an azide group to propidium iodide (PI) which has been satisfactorily been used for discrimination by fluorescence of viable bacteria in the commercial test LIVE/DEAD BacLight. The azide group, after a period of photo-exposure, produces a nitrene radical that covalently binds to DNA and preventing its use as a template in PCR. Recent studies have shown that this covalent bonding insolubilizes the DNA of damaged cells, resulting in its loss during genomic DNA extraction (Figure 3). The unbound PMA that remains free in solution is inactivated by photolysis and converted into hydroxylamine by reacting with water molecules so that it cannot bind to the DNA of viable cells in the subsequent stage of cell lysis (Nocker & Camper, 2009).

PMA technique combined with qPCR (PMA-qPCR) has been successfully tested for the selective detection and quantification of bacteria in food microbiology (Elizaquível *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2016). However, in the area of phytopathology knowledge, very few studies have been reported. In particular, it has been used to detect and/or monitor fungi (Sicard *et al.*, 2019; Vilanova *et al.*, 2017) and phytopathogenic bacteria (Meng *et al.*, 2016; Stulberg *et al.*, 2019).

The PMA-qPCR technique was first and successfully used for monitoring the BCA *P. agglomerans* CPA-2 (Soto-Muñoz *et al.*, 2014a). This technique allowed the detection and quantification of viable CPA-2 cells, as well as cells that enter a VBCN state as a result of stress experienced during their formulation process and drying methods by freeze-drying, spray-drying and fluidized bed drying (Soto-Muñoz *et al.*, 2015), as well as in the field environmental conditions or during fruit storage (Soto-Muñoz *et al.*, 2015ab). Recently, in a study done by Daranas *et al.* (2018), the reactive PEMAX, which is EMA (10 μ M) mixed with PMA (50 μ M), in combination with qPCR was used for the monitoring of a viable population of the BCA *Lactobacillus plantarum* PM411 in pear and apple flowers. Thus, the technique of usage of DNA intercalators in combination with qPCR could be a useful tool for the development of a BCA that could have multiple applications such as: (i) to determine BCA cell viability in the production phase, (ii) to determine the concentration of viable cells formulated by freeze-drying, spray-drying or fluid bed drying. In the case of a spray dried product, costs could be reduced by applying less product with the same effectiveness exhibited on high concentrations (iii) to evaluate the medium and long-term population monitoring of BCA after its application

discriminación, mediante fluorescencia, de bacterias viables en el test comercial LIVE/DEAD BacLight. El grupo azida, tras un periodo de foto-exposición, genera un radical nitreno que se une covalentemente al DNA e impide su amplificación por PCR. Estudios recientes han demostrado que esta unión covalente insolubiliza el DNA de células dañadas, lo que da lugar a su pérdida durante la extracción del DNA genómico (Figura 3). El PMA no unido que permanece libre en solución, se inactiva por fotólisis y se convierte en hidroxilamina al reaccionar con moléculas de agua, de modo que no puede unirse al DNA de células viables en la etapa posterior de lisis celular (Nocker & Camper, 2009).

La técnica de PMA en combinación con la qPCR (PMAqPCR) ha sido probada con éxito para la detección selectiva y cuantificación de bacterias en microbiología de alimentos (Elizaquível *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2016). Sin embargo, en el área de conocimiento de fitopatología son muy pocos los estudios reportados. En particular, se ha utilizado para detectar y/o monitorear hongos (Sicard *et al.*, 2019; Vilanova *et al.*, 2017) y bacterias fitopatógenas (Meng *et al.*, 2016; Stulberg *et al.*, 2019).

La técnica de PMA-qPCR se utilizó por primera vez y de manera exitosa para el monitoreo del BCA *P. agglomerans* CPA-2 (Soto-Muñoz *et al.*, 2014a). Esta técnica permitió detectar y cuantificar las células viables de CPA-2, así como las células que entran en estado VBCN como resultado del estrés que sufren durante su proceso de formulación y deshidratación por atomización, liofilización o lecho fluido (Soto-Muñoz *et al.*, 2015), así como en las condiciones ambientales de campo o durante el almacenamiento de la fruta (Soto-Muñoz *et al.*, 2015ab). Recientemente un estudio realizado por Daranas *et al.* (2018), utilizaron el reactivo PEMAX, que es una combinación 10 μ M EMA con 50 μ M PMA, en combinación con la qPCR, para monitorear la población viable del BCA *Lactobacillus plantarum* PM411 en flores de pera y manzana. Por tanto, la técnica de intercaladores de DNA en combinación con la qPCR podría ser una herramienta útil para el desarrollo de un BCA, ya que puede tener múltiples aplicaciones, por ejemplo: (i) para determinar la viabilidad de células de BCA en la fase de producción, (ii) para determinar la concentración de células viables formuladas por liofilización, atomización o lecho fluido. En el caso de un producto atomizado, se podrían disminuir costos, al aplicar menos producto con la misma eficacia que altas concentraciones (iii) para evaluar el seguimiento poblacional del BCA a medio y largo plazo después su aplicación en pre- y poscosecha, y (iv) como una

in pre- and post-harvest, and (iv) as a tool to determine the tolerance of BCA when it is submitted to different types of stress. In this method, it will be possible to understand the behavior of the antagonist and provide valuable data for registration purposes.

Conclusions

This review provides a general overview of the challenges associated with the development of a BCA, from its isolation to achieve a formulated and packed biological product for commercialization. From the recent advances in molecular techniques and genomic sequencing, it has been possible to specifically monitor several BCAs, to evaluate the environmental fate and behavior of the antagonist in the field and during storage, to provide valuable information for its registration. In the same way, these molecular techniques have allowed us the quantification of cells in VBCN state (result of the stress produces during the formulation process) and that had not been quantified yet, due to the limitations of the traditional microbiological methods. Taken together, the advances in genomics technologies will allow to evaluate more accurately the impact of a BCA on biodiversity and environment; that is, the effects on undesirable organisms, in such a way that in a short time a knowledge will be generated and likely lead to new paradigms in the scientific research of biological control.

herramienta para determinar la tolerancia del BCA cuando es sometido a diferentes tipos de estrés. De este modo, se podrá comprender el comportamiento del antagonista y proporcionar datos valiosos para fines de registro.

Conclusiones

En este artículo hemos dado una visión general del desafío que presenta el desarrollo de un BCA que va desde su aislamiento hasta la obtención de un producto biológico formulado y envasado, listo para comercializarse. Dado a los avances en técnicas moleculares y en la secuenciación de los genomas, ha sido posible monitorear específicamente diversos BCAs, evaluar el destino ambiental y el comportamiento del antagonista en condiciones de campo y durante el almacenamiento para proporcionar información valiosa para su registro. Del mismo modo, las técnicas moleculares han permitido cuantificar las células en estado VBCN, como resultado del estrés que sufren durante su proceso de formulación, y que no habían sido antes consideradas debido a las limitaciones del método microbiológico. Todo ello, en conjunto con los avances de las tecnologías "ómicas" permitirá evaluar con precisión el impacto de un BCA sobre la biodiversidad y el ecosistema; es decir, los efectos en organismos indeseables, de tal manera, que en poco tiempo se generará un conocimiento que probablemente originará nuevos paradigmas en la investigación científica del control biológico.

References

- Aguirre-Guitron, L., Calderon-Santoyo, M., Isela Ortiz-Basurto, R., Ulises Bautista-Rosales, P. & Arturo Ragazzo-Sanchez, J. (2018). Optimisation of the spray drying process of formulating the post-harvest biocontrol agent *Meyerozyma caribbica*. *Biocontrol Science and Technology*, 28(6), 574-590. <http://doi.org/10.1080/09583157.2018.1468997>
- Broggini, G. A. L., Duffy, B., Holliger, E., Schärer, H. J., Gessler, C. & Patocchi, A. (2005). Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) in a Swiss apple orchard. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 93-100. <http://doi.org/10.1007/s10658-004-1423-x>
- Carbó, A., Torres, R., Teixidó, N., Usall, J., Magan, N. & Medina, A. (2018). Predicted ecological niches and environmental resilience of different formulations of the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 using the Bioscreen C. *BioControl*, 63(6): 855-866. <https://doi.org/10.1007/s10526-018-09910-4>
- Chen, C., Zhang, W., Gao, W., Chen, W., Li, A., Zhang, Y., Liu, H., Zhang, L. (2010). Using a sequence characterized amplified region (SCAR) marker for detection of *Bacillus strain* TS02 sprayed on strawberry plants to bio-control powdery mildew in fields. *African Journal of Biotechnology*, 9(37), 6049-6055. <https://doi.org/10.5897/AJB10.679>
- Daranas, N., Bonaterra, A., Frances, J., Cabrefiga, J., Montesinos, E. & Badosa, E. (2018). Monitoring viable cells of the biological control agent *Lactobacillus plantarum* PM411 in aerial plant surfaces by means of a strain-specific viability quantitative PCR Method. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(10). <http://doi.org/10.1128/aem.00107-18>

- De Clercq, D., Cognet, S., Pujol, M., Lepoivre, P. & Jijakli, M. H. (2003). Development of a SCAR marker and a semi-selective medium for specific quantification of *Pichia anomala* strain K on apple fruit surfaces. *Postharvest Biology and Technology*, 29(3), 237-247. [http://doi.org/10.1016/s0925-5214\(03\)00044-9](http://doi.org/10.1016/s0925-5214(03)00044-9)
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D. & Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 22-29. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D. & Jijakli, M.H. (2019). Biocontrol of postharvest diseases with antagonistic microorganisms. In: Lluís, P., Joseph, S.L. (Eds.), *Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA. <http://doi.org/10.1201/9781315209180-14>
- Elizaquível, P., Aznar, R. & Sánchez, G. (2014). Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *Journal of Applied Microbiology*, 116(1): 1-13. <http://doi.org/10.1111/jam.12365>
- Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C. R., Balderas-Ruiz, K. A., Muñoz-Celaya, A. L., Mezo-Villalobos, M. & Arroyo-Colín, J. (2015). Desarrollo histórico y los retos tecnológicos y legales para comercializar Fungifree AB®, el primer biofungicida 100% mexicano. TIP. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 18(1): 52-60. <http://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.005>
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Usall, J., Dashevskaya, S. & Torres, R. (2016). Development of a SCAR marker and a strain-specific genomic marker for the detection of the biocontrol agent strain CPA-8 *Bacillus amyloliquefaciens* (formerly *B. subtilis*). *Annals of Applied Biology*, 169(2): 248-256. <http://doi.org/10.1111/aab.12298>
- Holmberg, A.-I. J., Melin, P., Levenfors, J. P. & Sundh, I. (2009). Development and evaluation of SCAR markers for a *Pseudomonas brassicacearum* strain used in biological control of snow mould. *Biological Control*, 48(2): 181-187. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.10.016>
- Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M. J., Hall, G. S. & Bauer, T. W. (2009). Unsuitable distinction between viable and dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by ethidium bromide monoazide. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5): 633-638. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02585.x>
- Koehl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M. & Blum, B. (2011). Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control*, 57(1): 1-12. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.12.004>
- Larena, I. & Melgarejo, P. (2009). Development of a new strategy for monitoring *Epicoccum nigrum* 282, a biological control agent used against brown rot caused by *Monilinia* spp. in peaches. *Postharvest Biology and Technology*, 54(2): 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.05.007>
- Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R. & De Cicco, V. (2003). Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 341-349. <https://doi.org/10.1023/A:1023595529142>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S. & Liu, Y. S. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2): 153-160. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- Martini, M., Moruzzi, S., Ermacora, P., Loi, N. & Firrao, G. (2015). Quantitative real-time PCR and high-resolution melting (HRM) analysis for strain-specific monitoring of fluorescent pseudomonads used as biocontrol agents against soil-borne pathogens of food crops. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2): 277-285. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.017>
- Massart, S., De Clercq, D., Salmon, M., Dickburt, C. & Jijakli, M. H. (2015). Development of real-time PCR using Minor Groove Binding probe to monitor the biological control agent *Candida oleophila* (strain O). *Journal of Microbiological Methods*, 60(1): 73-82. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.08.012>
- Meng, X., Chai, A., Chen, L., Shi, Y., Xie, X., Ma, Z., & Li, B. (2016). Rapid detection and quantification of viable *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* cells in contaminated cucumber seeds using propidium monoazide and a real-time PCR assay. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(3): 296-306. <http://doi.org/10.1080/07060661.2016.1216897>
- Nocker, A. & Camper, A. K. (2009). Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiology Letters*, 291(2): 137-142. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01429.x>

- Nogva, H. K., Dromtorp, S. M., Nissen, H. & Rudi, K. (2003). Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*, 34(4): 804-813. <https://doi.org/10.2144/03344rr02>
- Nunes, C., Bajji, M., Stepien, V., Manso, T., Torres, R., Usall, J. & Jijakli, M.H. (2008). Development and application of a SCAR marker to monitor and quantify populations of the postharvest biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Postharvest Biology and Technology*, 47(3): 422-428. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.07.016>
- Pujol, M., Babosa, E., Cabrefiga, J. & Montesinos, E. (2005). Development of a strain-specific quantitative method for monitoring *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, a novel biocontrol agent of fire blight. *FEMS Microbiology Letters*, 249: 343-352. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.029>
- Pujol, M., Badosa, E., Manceau, C. & Montesinos, E. (2006). Assessment of the environmental fate of the biological control agent of fire blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and real-time PCR methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2421 - 2427. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2421-2427.2006>
- Rotolo, C., Angelini, R. M. D. M., Pollastro, S. & Faretra, F. (2016). A TaqMan-based qPCR assay for quantitative detection of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* strain QST713 and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum strain D747. *BioControl*, 61(1): 91-101. <http://doi.org/10.1007/s10526-015-9701-4>
- Schena, L., Sialer, M. F. & Gallitelli, D. (2002). Molecular detection of strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Disease*, 86(1): 54-60. <http://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.1.54>
- Schena, L., Li Destri Nicosia, M. G., Sanzani, S. M., Faedda, R., Ippolito, A. & Cacciola, S. O. (2013). Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes. *Journal of Plant Pathology*, 7-24. <http://doi.org/10.4454/JPP.V95I1.016>
- Sicard, A., Merfa, M. V., Voeltz, M., Zeilinger, A. R., De La Fuente, L. & Almeida, R. P. P. (2019). Discriminating between viable and membrane-damaged cells of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Plos One*, 14(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0221119>
- Soto-Muñoz, L., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I. & Torres, R. (2014). Detection and quantification by PCR assay of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 on apples. *International Journal of Food Microbiology*, 175: 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.014>
- Soto-Muñoz, L., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., Crespo-Sempere, A. & Torres, R. (2014a). Development of PMA real-time PCR method to quantify viable cells of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist to control the major postharvest diseases on oranges. *International Journal of Food Microbiology*, 180: 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.011>
- Soto-Muñoz, L., Torres, R., Usall, J., Viñas, I., Solsona, C. & Teixidó, N. (2015). DNA-based methodologies for the quantification of live and dead cells in formulated biocontrol products based on *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology*, 210: 79-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.013>
- Soto-Muñoz, L., Torres, R., Usall, J., Viñas, I., Dashevskaya, S. & Teixidó, N. (2015a). Environmental monitoring of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 applied to citrus fruit at preharvest. *Annals of Applied Biology*, 167(2): 250-261. <https://doi.org/10.1111/aab.12224>
- Soto-Muñoz, L., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., Abadias, M. & Torres, R. (2015b). Molecular tools applied to identify and quantify the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 in postharvest treatments on oranges. *Postharvest Biology and Technology*, 100: 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.10.004>
- Spadaro, D., Sabetta, W., Acquadro, A., Portis, E., Garibaldi, A. & Gullino, M. L. (2008). Use of AFLP for differentiation of *Metschnikowia pulcherrima* strains for postharvest disease biological control. *Microbiological Research*, 163(5): 523-530. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.004>
- Spotts, R.A., Wallis, K.M., Serdani, M., O'Gorman, D.T. & Sholberg, P.L. (2009). Real time polymerase chain reaction for rapid and quantitative determination of *Cystofilobasidium infirmominiatum* on the surfaces of apple, pear, and sweet cherry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 51(2): 227-231. <doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.07.015>
- Stulberg, M. J., Santillana, G., Studholme, D. J., Kasiborski, B., Ortiz-Castro, M., Broders, K., Arias, S., Block, C., Munkvold, G. P. & Rascoe J. (2019). Genomics-informed molecular detection of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains causing severe bacterial leaf streak of corn. *Phytopathology*. <http://doi.org/10.1094/phyto-12-18-0453-r>
- Usall, J., Torres, R. & Teixido, N. (2016). Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative? *Current*

- Opinion in Food Science*, 11: 51-55. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.002>
- Vilanova, L., Usall, J., Teixidó, N. & Torres, R. (2017). Assessment of viable conidia of *Monilinia fructicola* in flower and stone fruit combining propidium monoazide (PMA) and qPCR. *Plant Pathology*, 66(8): 1276-1287. <http://doi.org/10.1111/ppa.12676>
- Vilaplana, R., Cifuentes, C., Vaca, L., Cevallos-Cevallos, J. M. & Valencia-Chamorro, S. (2020). Curative activity of possible biocontrol agents in the postharvest of yellow pitahaya and organic banana. *Postharvest Biology and Technology*, 159, 111030. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111030>
- Zeng, D., Chen, Z., Jiang, Y., Xue, F. & Li, B. (2016). Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 7. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01833>