

RESUM

El Coure ha estat el principal agent de protecció contra les malalties criptogàmiques en cultius ecològics. No obstant, en els últims anys s'ha restringit el seu ús i l'objectiu europeu a llarg termini és la seva substitució per alternatives més respectuoses amb el medi ambient. El control biològic utilitzant microorganismes antagonistes és una eina eficaç i una estratègia compatible amb els models d'agricultura sostenible i regenerativa. En aquesta acció hem estudiat la diversitat de la microbiota autòctona, la seva funcionalitat i la seva relació amb paràmetres de qualitat del sòl, hem aïllat microorganismes ben adaptats a les condicions dels cultius locals i hem avaluat la seva capacitat antagonista. Aquest treball s'ha desenvolupat amb les empreses de producció biodinàmica i bioregenerativa "Verd Camp Fruits" (Cambrils) i el "Celler Clos Mogador" (DOQ Priorat).

S'ha estudiat la diversitat microbiana (fongs i bacteris) de la rizosfera de 7 parcel·les utilitzant tècniques de seqüenciació massiva (metabarcode). S'han generat informes BeCrop que han permès determinar els principals riscos de malalties i la presència d'agents de control biològic. Les tècniques dependents de cultiu ens van permetre aïllar més de 100 soques de gèneres de fongs reconeguts per la seva activitat antagonista.

Els resultats obtinguts representen un petit pas dintre de les estratègies per arribar a una agricultura més sostenible però són prometedors. Productors i microbiòlegs estem desitjant continuar avançant en aquest repte.

01. Introducció

Les malalties criptogàmiques són malalties de les plantes causades per fongs vertaders del Regne Fungi o per pseudofongs anomenats oomicets. Els oomicets són eucariotes microscòpics que inclouen algunes de les espècies més destructives ecològicament. El míldiu representa una de les malalties més esteses i que provoca grans pèrdues econòmiques, tant en els cultius hortícoles com a la vinya. La simptomatologia de la malaltia es divideix en dos grans grups, míldiu pulverulent (*powdery mildew*) a causa de l'abundant esporulació que es visualitza com una pols blanquinosa, i el míldiu vellós o pilós (*downy mildew*), on els primers símptomes són les "taques d'oli" al damunt de les fulles i que es corresponen amb un borrisol blanquinós al revers de la fulla produït pels esporangis que irrompen a través dels estomes. Tot i la similitud dels noms i algunes semblances superficials, els agents causals són molt diferents; uns són fongs vertaders del Regne Fungi i, els altres, espècies de pseudofongs (oomicets) del Regne Chromista. Tot i les diferències, el que tenen en comú ambdós grups d'organismes és la seva capacitat de perdurar en el sòl per uns quants anys mitjançant propàguls dorments, o en estat de latència, que s'activen quan les condicions d'humitat i temperatura són propícies, donant lloc a infeccions primàries. D'altra banda, són organismes que es propaguen amb una gran facilitat i d'aquí les seves devastadores conseqüències quan les condicions els són favorables.

Però les malalties criptogàmiques inclouen un ampli rang d'afectacions, com les malalties a les parts llenyoses. En viticultura, a les malalties de la fusta se les coneix en anglès com *Grape Trunk Diseases* (GTD) i a dia d'avui no tenen tractament eficaç (de Almeida et al. 2020). De fet, són tant devastadores que es considera la major

problemàtica en la viticultura, reduint la productivitat i longevitat dels cultius (Díaz et al. 2013). Els agents causals són diversos, entre ells, es troben *Phaeoacremonium minimum*, *Seimatosporium vitis*, *Diplodia seriata* i *Didymella glomerata* (Díaz et al. 2013; Cobos et al. 2022; de Almeida et al. 2020; Mondello et al. 2018; Cimmino et al. 2021).

Segons el llibre blanc per a la producció agroecològica (Descombes et al. 2007), així com la publicació resultant del projecte *Life Priorat* pel desenvolupament d'una viticultura de muntanya sostenible, els fungicides preventius basats en compostos de coure són respectuosos amb el medi ambient (Pérez i Feliu 2007). No obstant això, Descombes i col·laboradors (2007) ja advertien sobre la problemàtica amb aquests tipus de compostos i suggerien la recerca de fitosanitaris alternatius que s'ajusten als principis de la producció agroecològica.

Encara que l'ús del coure s'ha reduït dràsticament gràcies a les noves formulacions i a les millores en les tècniques d'aplicació, el seu ús freqüent com a fungicida foliar ha provocat la seva acumulació en el sòl, a conseqüència en part de la seva mobilitat limitada, relacionada amb el contingut d'argila del terra i amb el contingut de matèria orgànica. D'altra banda, com les dosis efectives per a la seva acció fitosanitària superen les necessitats de captació de micronutrients per part de les plantes, el resultat a llarg termini és la contaminació per coure dels sòls. Com a resultat, l'equilibri en la microbiota del sòl es veurà afectat i en conseqüència també els processos de reciclatge dels nutrients i, per tant, la fertilitat.

Per una altra banda, la protecció química de les plantes contra les malalties fúngiques no només perjudica els patògens diana, sinó que pot causar efectes perjudicials sobre diversos organismes beneficiosos, com la

microbiota sapròfita, els insectes, animals, i les pròpies plantes, resultant en la pèrdua de biodiversitat, funcionalitat i resiliència dels sòls de conreu. Així mateix, exerceixen una pressió biològica que afavoreix la selecció d'organismes resistents, provocant la persistència dels fitopatògens altament virulents.

En aquest context, el repte és trobar alternatives als compostos químics que siguin eficients en la viticultura i en l'agricultura ecològica, i que no interfereixin amb la microbiota beneficiosa que es desenvolupa i interacciona a la interfície sòl-planta.

Una d'aquestes alternatives fitosanitàries és el control biològic, que es defineix com la reducció de la quantitat o l'activitat d'un patògen en el seu estat actiu o dorment, per part d'un o més microorganismes. Aquests microorganismes s'anomenen agents de control biològic (BCA) o antagonistes. Els antagonistes comparteixen i competeixen pels mateixos nínxols que els fitopatògens, per això són aïllats de la filosfera (microambient de la fulla) o la rizosfera (microambient del sòl influenciat per les arrels de la planta). Per tant, una altra de les avantatges del ús de BCA és que són capaços d'establir-se a l'ecosistema, reproduir-se i colonitzar la filosfera i/o la rizosfera, de forma que el seu efecte és molt més perllongat que l'aplicació de fungicides químics (Silva et al. 2019) i són compatibles amb el nou model d'agricultura sostenible i regenerativa.

Els fongs són microorganismes especialment interessants com BCAs degut a la ràpida producció d'espores que romanen latents i la seva especificitat d'acció (Thambugala et al. 2020). Diversos gèneres fúngics s'han identificat com a agents de biocontrol, entre els quals destaquen *Alternaria*, *Chaetomium*, *Epicoccum*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Talaromyces*, i *Trichoderma*. Especialment destacable, per la seva diversitat de mecanismes d'acció es troben les espècies del gènere *Trichoderma* (Adnan et al. 2019; Thambugala et al. 2020).

Tanmateix, cada ecosistema té la seva pròpia composició i dinàmica de microorganismes, i les espècies que hi habiten interaccionen entre elles i amb l'entorn. Aquests aspectes són crucials a l'hora d'introduir agents de control biològic als cultius. La introducció de BCAs, tant en forma d'organismes vius com de metabòlits, modificarà inevitablement la composició i funció de tot l'ecosistema, sigui de forma temporal o permanent.

Un dels problemes que en ocasions pateixen els agricultors amb els bioproductes que es troben actualment al mercat és la falta d'activitat o efectivitat. Això és degut a la falta d'adaptació de les soques antagonistes a les condicions de l'ecosistema on s'apliquen, on els microorganismes assajats o els bioproductes són produïts a quilòmetres del territori o inclús a partir de soques forànies. Les comunitats residents no solen veure's afectades per l'aplicació d'altres microorganismes, probablement degut a l'adaptació a l'entorn del cultiu local i la resistència a la

introducció de nous microorganismes (Mayerhofer et al. 2017, Perazzolli et al. 2014).

En el marc d'aquesta problemàtica general, el nostre principal propòsit és contribuir en el procés de transformació del model de producció agrícola en un de més sostenible i ecològic. En aquest sentit els nostres esforços es centraran en la **recerca de fongs amb activitat antagonista**. La nostra estratègia es basarà en la **utilització de la microbiota autòctona**, evitant així la incorporació de microorganismes aliens a l'ecosistema.

02. Metodologia

Les mostres es van col·lectar entre maig i novembre de 2021 en camps de vinya diversos de l'empresa col·laboradora "Clos Mogador SL" (Camí Manyetes s/n, 43737, Gratallops, Tarragona) i àrees de cultiu hortícola de l'Empresa Verd Camp Fruits SAT (Camí de Mont-roig, s/n, "Masia Barrabeig", 43850, Cambrils, Tarragona).

Es van realitzar quatre mostrejos de sòl entre els mesos de maig i novembre de 2021. Es va estudiar la microbiota de vuit parcel·les de vinya (Garnatxa, Syrah, Carinyena) i 10 parcel·les amb cultius de l'horta (síndria, carbassó, carbassa, faves, cogombre, ceba, col i fonoll).

La recol·lecció de la mostra es va fer amb una barrina a una distància de 30 cm de l'eix principal de la planta i a una profunditat entre 10–15 cm. De cada parcel·la es van mostrejar sis punts tal i com es mostra a la Figura 1. Les mostres de cada punt es van col·locar en bosses de plàstic de forma independent.

Per a la determinació de la diversitat microbiana per *metabarcode* es van seleccionar 7 parcel·les. Les mostres de cada punt se'n van homogeneïtzar i es van prendre 2 g que es van barrejar en un recipient estèril. Aquesta mostra composta es va homogeneïtzar, i es va obtenir una fracció que es va destinar a la seqüenciació massiva.

També es van analitzar diferents parts vegetals (fulles, sarments, braços, raquis d'inflorescència...). Aquest material va ser enviat directament pels viticultors quan apareixien símptomes compatibles amb mildiu o altres malalties criptogàmiques (Clos Mogador, Orto Vins, Vinya experimental INCAVI, Agrícola de Barberà S.C.C.L).

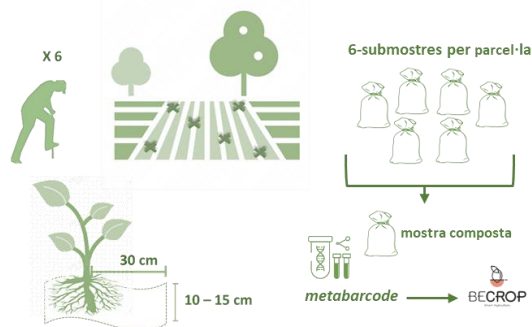


Figura 1. Esquema representatiu de la presa de mostres de sòl i de preparació de la mostra composta per als anàlisis metabarcodats.

02.01. Aïllament de fongs

Mostres de rizosfera

Aproximadament 1-2 g de sòl es van suspendre en 10 ml d'aigua estèril i posteriorment la suspensió es va repartir en tres plaques de Petri amb medi de cultiu, preferentment agar Dicloran-Rosa-Bengala-Cloramfenicol (DRBC), i Patata Dextrosa Agar (PDA; Pronadisa, Madrid Spain). Totes les plaques s'incubaren a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en la foscor, sent examinades periòdicament durant 2-4 setmanes.

Activació d'espores latents

Paral·lelament, les mostres es van sotmetre a una activació de les espores amb fenol (1 gram de terra es va dissoldre en 5 ml de fenol al 2%), es va agitar i incubar a temperatura ambient durant 5 minuts, se'n va decantar el fenol i es va re-suspendre la mostra en 10 ml d'aigua destil·lada estèril. Aquest procediment té com a finalitat activar les espores latents o dorments presents en la mostra. Les mostres es van sembrar en massa en dues plaques de DRBC i dues de Potato Carrot Agar (PCA), de les quals una de cada medi de cultiu es va incubar a 15°C i 25°C .

Processament de teixits vegetals

Els teixits vegetals amb símptomes i/o signes d'infecció es van rentar amb aigua destil·lada estèril. Posteriorment, es van submergir en hipoclorit de sodi al 5% durant 3 minuts, i es van rentar de nou amb aigua destil·lada estèril. Algunes de les mostres es van tallar en fragments petits en condicions estèrils amb l'ajut d'un bisturi i es van sembrar en superfície en plaques de Synthetic Nutrient-poor Agar (SNA). Paral·lelament, part de les mostres es van incubar en cambra humida, on les mostres es dipositen sobre paper de filtre humidificat amb aigua destil·lada estèril dins de plaques de Petri. Les plaques es van incubar a 25°C i es van revisar amb lupa binocular per tal de detectar i aïllar els fongs fitopatògens i/o endòfits.

02.02. Obtenció de cultius purs i conservació de les soques

Es va fer una selecció dels aïllats fúngics a partir de les mateixes plaques de sembra, mitjançant una identificació morfològica presumptiva a nivell gènere. Aquesta identificació es va basar en l'estudi microscòpic de les estructures observades a partir de preparacions fetes amb àcid làctic (85%) i examinades en un microscopi òptic de camp clar o de contrast de fases.

Es van obtenir cultius purs a partir de petites porcions de les colònies o espores dels fongs transferides amb ajuda d'una agulla hipodèrmica a tres plaques contenint, respectivament, Oatmeal Agar (OA), PDA i PCA per afavorir l'esporelació dels fongs. Totes aquestes plaques s'incubaren a temperatura ambient ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) en la foscor.

Els cultius purs es van sembrar en tubs amb agar inclinat de PCA i OA per tal de crear una col·lecció de soques de treball. També es van sembrar en plaques d'agar PDA i es

van incubar durant 5 a 7 dies a 25°C en obscuritat. Del cultiu en PDA se'n va fer la preservació de les soques tant liofilitzades com conservades en aigua. Tots els aïllats es van depositar en la col·lecció de la Facultat de Medicina de Reus (FMR).

02.03. Identificació molecular i metabarcoding (BeCrop®)

La identificació molecular (gènere i espècie) dels aïllats es va fer a través de la seqüenciació dels espaiadors intergènics (regió ITS) i els dominis D1-D3 del gen 28S de l'operó d'RNA ribosòmic. Amb aquestes seqüències, es va fer una cerca BLASTn al GenBank i a la base de dades de seqüències del *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (CBS) per determinar el percentatge d'identitat entre les nostres seqüències i les dipositades a les bases de dades. En els casos en que un marcador únic no és suficient per garantir una identificació molecular fiable (% d'identitat $\geq 98,0\%$), es recorre a la seqüenciació d'altres gens més discriminatòris (*tef1*, *act*, *benA*, *rpb2*, *cmdA*, etc).

Per altra banda, l'anàlisi del metabarcoding es basa en la seqüenciació massiva de les regions 16S (codi de barres per bacteris) i ITS (codi de barres per fongs) de l'ARN ribosòmic (rRNA) de les mostres de terra. Amb aquesta informació, s'elaboren informes intuïtius sobre la biodiversitat, funcionalitat, qualitat i resistència del cultiu en relació amb la microbiota que hi habita. Cal aclarir que l'eina BeCrop no mesura la quantitat de nutrients, sinó els processos microbians que intervenen en el cicle dels nutrients, com els que subministren a les plantes en forma de nutrients disponibles (per exemple, la mineralització o la solubilització) i els que immobilitzen els nutrients de nou en formes no fàcilment disponibles per a les plantes (immobilització).

02.04. Avaluació de la capacitat antagonista

L'assaig de la capacitat antagonista es va dur a terme mitjançant el mètode del cultiu dual, que avalua la capacitat d'inhibir el creixement dels fitopatògens per contacte directe, competència i/o la producció de substàncies no volàtils.

L'activitat antagonista per competència o per parasitisme es va avaluar en plaques amb medi PDA. Es van col·locar en extrems oposats un disc de 5 mm d'un cultiu de 7 dies del patogen i de l'antagonista. Per avaluar la inhibició per metabòlits volàtils es van fer servir plaques dividides en dues seccions diferenciades. Totes les plaques es van incubar a 25°C . El radi de creixement de les soques fitopatògenes es va mesurar els dies 5, 7 i 14 dies de cultiu. Com a control es van utilitzar plaques amb un únic disc de cultiu del fitopatogen col·locat en un extrem. Es van fer tres rèpliques per cada cultiu i condició.

El percentatge d'inhibició del creixement radial es va calcular segons la fórmula d'Stracquadanio et al. (2020):

$$PICR\% = \frac{D_c \times D_t}{D_c} \times 100$$

On PICR% és el percentatge d'inhibició del creixement; Dc és la mesura del creixement del patògen (control); Dt és la mesura del creixement del patògen en presència del potencial biocontrolador.

03. Resultats

La utilització de productes químics durant dècades ha provocat l'erosió i contaminació del sòl i la pèrdua de diversitat microbiana. La microbiota, i especialment els fongs associats a la rizosfera, constitueix un dels principals components d'aquest ecosistema, que actuen com mecanismes de control contra els patògens i regulen els cicles dels nutrients. Per això la composició microbiana del sòl i la rizosfera està lligada a l'estat de salut dels cultius.

En aquest estudi es va analitzar la diversitat microbiològica del sòl en cultiu ecològic de vinya i d'horta a través de la seqüenciació directa de l'ADN de les mostres de sòl (*metabarcoding*). Es van seleccionar parcel·les explotades durant diversos anys aplicant tècniques d'agricultura ecològica-biodinàmica o regenerativa i es van comparar amb altres en que aquestes estratègies es van aplicar durant menys de dos anys (parcel·les "convencionals"). En el cas de l'estudi en horta, es va seleccionar el cultiu de carabassa.

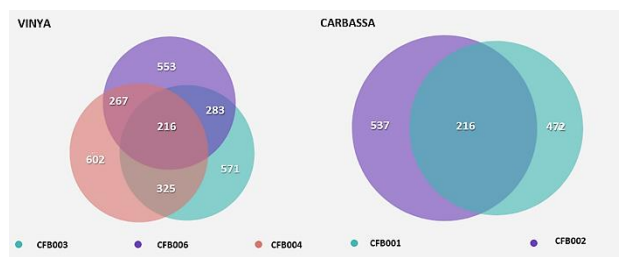


Figura 2. Diagrama de Venn mostrant les unitats taxonòmiques operatives (fongs i bacteris) comunes i exclusives de les parcel·les estudiades. Els cercles superposats representen les parcel·les. Vinya eco.: CFB003, CFB006; convencional CFB004. Carabassa eco.: CFB001; cultiu convencional CFB000.

Amb les dades obtingudes es va poder avaluar la concordança entre les mostres a través del diagrama de Venn (Fig. 2). Aquest anàlisi es va realitzar a la plataforma BeCrop de Biome Makers.

A la vinya s'observa que la parcel·la CFB004 té un major nombre de taxons associats que les parcel·les ecològiques. D'altra banda, les parcel·les més properes CFB003 i CFB004 comparteixen més microorganismes entre si que les d'un mateix maneig, però es troben més allunyades. En estudis recents, s'ha demostrat que hi ha importants variacions en relació a la comunitat bacteriana i fúngica en la mateixa vinya sota les mateixes condicions de maneig i que això podria estar relacionat amb les característiques edàfiques com ara la qualitat del sòl, el pH i el carboni orgànic a terra (Liang et al. 2019). En aquest punt vam voler comprovar si les parcel·les ecològiques tenien alguna diferència respecte a la presència de gèneres fúngics amb coneguda activitat antagonista. Es va demostrar la presència de *Trichoderma* a totes les parcel·les, no obstant això, no van ser

detectades espècies de *Chaetomium* a la parcel·la de cultiu convencional CFB004. Els gèneres *Chaetomium* i *Trichoderma* han estat descrits com a part dels organismes que contribueixen a la salut de les plantes, bé per la seva activitat com a estimuladors del creixement o per la seva habilitat per suprimir agents fitopatògens (Barelli et al. 2019). A les dues parcel·les es detecten gèneres d'activitat antagonista com *Chaetomium*, *Stachybotrys* i *Trichoderma*, no obstant els percentatges detectats són molt baixos. A les parcel·les estudiades, els gèneres fúngics prevalents van ser *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mortierella* i *Solicoccozyma*. Això coincideix amb el que han informat Gobbi i col·laboradors (2022) en analitzar 200 vinyes arreu del món. A més, es va detectar la presència en relativa abundància d'espècies de *Didymella* i de *Fusarium*, espècies generalment fitopatògenes. Igualment, això no implica un risc directe, ja que dependrà de l'estat funcional de la microbiota de la rizosfera i de les interaccions que s'estableixen entre patògens i antagonistes.

Per al cultiu de la carabassa trobem que ambdues parcel·les comparteixen entre el 40-45% de la seva microbiota, no obstant les parcel·les es troben geogràficament distants i la parcel·la de cultiu convencional es troba en un medi amb molta alteració antròpica, ja que es localitza al costat de l'autovia. A les dues parcel·les es detecten gèneres d'activitat antagonista com *Chaetomium*, *Stachybotrys* i *Trichoderma*, no obstant els percentatges detectats són molt baixos.

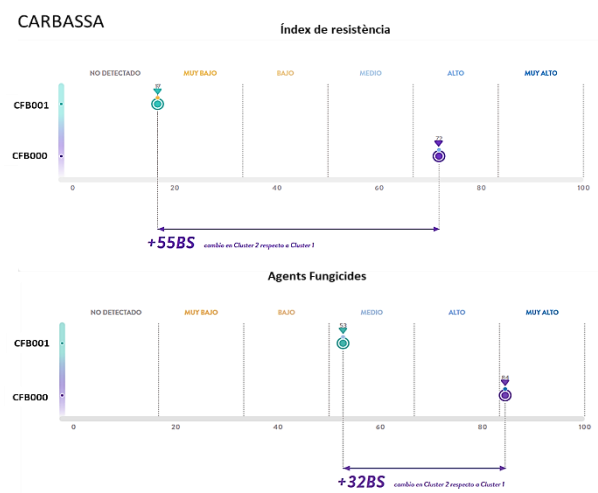


Figura 3. Estimació del Índex de resistència del sòl i de l'activitat antifúngica en Carabassa amb maneig ecològic CFB000 i cultiu convencional CFB001.

L'estudi del *metabarcoding* de la plataforma BeCrop ens va permetre fer estimacions predictives sobre la resistència del cultiu a l'estrès abiòtic i biòtic tenint en compte la diversitat funcional dels organismes detectats i la capacitat de la rizosfera de controlar els organismes patògens a través de les seves relacions antagòniques. A les Figures 3 i 4 es pot observar com les parcel·les de

cultius ecològics i biodinàmics podrien presentar una major resistència i una major activitat fungicida. És a dir, el microbioma en aquest tipus de maneig té més capacitat per respondre als desequilibris abiòtics o a l'atac de fongs fitopatògens. La diversitat d'agents amb activitat antagonista o estimuladors del creixement poden marcar la diferència en relació a la protecció de les plantes és a dir, sòls conductius o sòls supressius de les malalties.

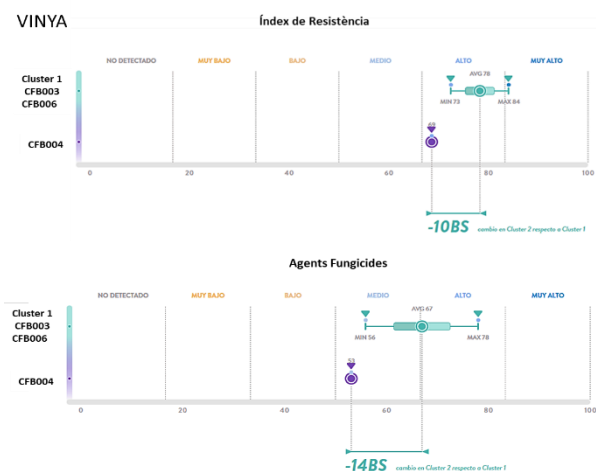


Figura 4. Estimació del Índex de resistència del sòl i de la activitat antifúngica en Vinya amb maneig ecològic: CFB003, CFB006; convencional CFB004.

Els cultius ecològics i biodinàmics presenten una major resistència, una major activitat fungicida i són més resilents.

Un cop determinats els fongs antagonistes presents a les parcel·les en estudi a través de la seqüenciació massiva, s'han aplicat les tècniques i els medis de cultiu selectius adequats pel seu aïllament en cultiu pur.

Les soques es van aïllar de la rizosfera i de teixits sans de les fulles. Es van decidir aïllar principalment espècies d'*Epicoccum*, *Chaetomium*, *Stachybotrys* i *Trichoderma*, donat que treballs previs avalen l'eficàcia d'algunes de les seves espècies com antagonistes contra reconeguts fitopatògens de la vinya i diferents cultius hortícoles (Diànez et al. 2015, Ribeiro et al. 2018, Del Frari 2019, Zin i Badaluddin 2020, Christova i Slavov 2021).

Els gèneres més freqüents en cultiu van ser *Chaetomium* i *Trichoderma*, i es van poder recuperar de la majoria de les mostres analitzades, tant de l'horta com de les vinyes. S'han aïllat 63 soques de *Chaetomium* o *Chaetomium-like*, que van ser inicialment identificats per la característica morfològica del teleomorfe, que forma ascomes setosos (cossos fructífers de la forma sexual). Del gènere *Trichoderma* se n'han recuperat 34 aïllaments. La identificació molecular ens ha permès confirmar 19 espècies del grup *Chaetomium-Chaetomium-like* i 9 espècies de *Trichoderma*.

Fins ara s'han identificat molecularment el 70% de les espècies *Chaetomium-like* i el 68% de les espècies de *Trichoderma* (Figs. 5 i 6).

Les espècies més freqüents entre les soques de *Chaetomium-like* han estat *Arcopilus cupreus* (= *Chaetomium cupreum*), *Chaetomium carinthiacum* i *Arxotrichum succineum* (= *Chaetomium succineum*) amb 8, 6 i 5 aïllats, respectivament (Fig. 5). Aquestes espècies es van aïllar únicament de les parcel·les de vinya, tant les de cultiu ecològic com de la parcel·la convencional i en totes les varietats (Carinyena, Garnatxa i Syrah). *Collariella bostrychodes* (= *Chaetomium bostrychodes*) (representat per 5 aïllats) es va recuperar tant de vinya com de cultius hortícoles.

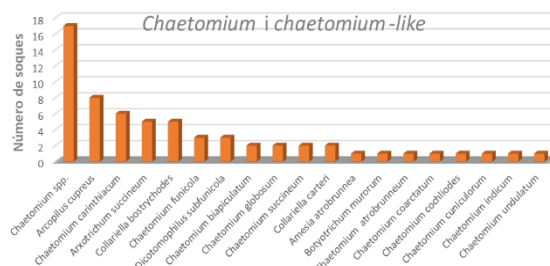


Figura 5. Diversitat d'espècies de *Chaetomium* i *chaetomium-like* aïllades de sòl i material vegetal de cultius d'hort i vinya (totes les referències i dades sobre les tècniques d'aïllament/medi de cultiu, substrat, etc. es troben a la col·lecció de cultius FMR).

Aquestes dades no reflecteixen la veritable distribució ni abundància d'aquestes espècies a la vinya i l'horta. Per conèixer aquestes dades s'haurien de fer estudis sistemàtics, cosa que contribuiria a determinar-ne la importància en aquests ecosistemes agrícoles. Les espècies de *Chaetomium* han estat extensament estudiades pels seus efectes protectors als cultius, per la seva capacitat per controlar les malalties i per promoure el creixement vegetal (Soytong et al. 2021).

Amb relació a les espècies de *Trichoderma* identificades fins ara, la més freqüentment aïllada va ser *Trichoderma harzianum* (n=9) seguida de *Trichoderma gamsii* (n=4) (Fig. 6). *Trichoderma harzianum* es va aïllar de vinya i de cultius hortícoles, mentre que *T. gamsii* només es va recuperar de rizosfera vinya.

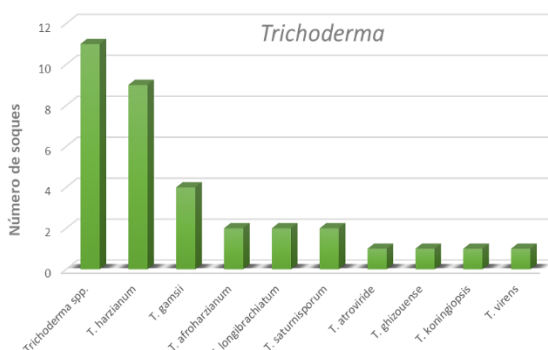


Figura 6. Diversitat d'espècies de *Trichoderma* aïllades de sòl i rizosfera de cultius d'hort i vinya (totes les referències i dades sobre les tècniques d'aïllament/medi de cultiu, substrat, etc. es troben a la col·lecció de cultius FMR).

Diverses mostres de material vegetal van ser rebudes al nostre laboratori per examinar la simptomatologia compatible amb míldiu de la vinya provinent de diferents productors (Barberà de la Conca, Gratallops, el Masroig i de Vilafranca del Penedès). Les mostres de fulles van ser examinades i incubades i no es van trobar els signes característics que ocasiona l'agent causal *Plasmopara viticola* (míldiu). Les infeccions per oomicets no van ser explosives durant l'any 2021 ni el 2022. Les condicions de primavera menys plujosa no van propiciar el desenvolupament de la malaltia a gran escala i no es va poder aïllar *P. viticola*. L'anàlisi de metagenòmica no el va detectar a la rizosfera a cap de les parcel·les analitzades del Cellar Clos Mogador ni tampoc es van recobrar soques a partir de les tècniques de *baiting*. Tot i això, les mostres de material vegetal es van processar, es van incubar i van ser revisades periòdicament.

Fins ara s'han pogut identificar morfològicament 6 soques del gènere *Alternaria* (Seccions *Alternaria*, *Ulocladium* / *Ulocladioides*), 7 soques d'*Epicoccum* i 16 soques de *Stemphylium*. Es van treballar a més algunes mostres de parts llenyoses amb símptomes de malalties de la fusta de diferents procedències. Es van aïllar en cultiu pur i es van identificar les espècies *Diplodia seriata*, *Didymella glomerata* i *Seimatosporium vitis*.

De totes aquestes, les espècies del gènere *Epicoccum* són aïllades com a endòfits. A la vinya han estat trobades a la fusta, tant de material sa com infectat per diferents agents causals de malalties ("grapevine trunk diseases", GTD), altres han estat aïllades de la filosfera de fruits i fulles (Del Frari et al. 2019, Hou et al. 2020); sent *Epicoccum nigrum* l'espècie més freqüent. Algunes espècies del gènere mostren activitat biològica contra diferents fitopatògens (Taguam et al. 2021; Kolenkova et al. 2022).

Finalment, s'han aïllat i identificat morfològicament 8 soques *Stachybotrys-Memnoniella-like*. Habitualment, aquestes soques són tant d'horta com de vinya i s'han aïllat de rizosfera, terra o material vegetal. Les espècies d'aquest grup d'organismes són conegudes productores de metabòlits secundaris biològicament actius i pel control de fongs fitopatògens a través del micoparasitisme (Martins et al. 2015, Menendes 2015, Elkhateeb i Ghoson 2022).

Es troben disponibles per a futurs assaigs més de 110 soques fúngiques amb activitat antagonista reconeguda contra diferents fitopatògens

03.01. Avaluació de la capacitat antagonista

Per als assajos *in vitro* es van seleccionar una soca d'*Arcopilus cupreus* (FMR 19716); dues soques de *Chaetomium*: *C. globosum* (FMR 19699) i *C. cochliodes* (FMR 19700); dues soques d'*Epicoccum*: *E. nigrum* (FMR 19857) i *Epicoccum* sp. (FMR 19857) i dues soques de *Trichoderma*: *T. atroviride* (FMR 19306) i *T. harzianum*

(FMR 19312) (Fig. 7). Els assajos es van realitzar enfrontant *Diplodia seriata* i *Didymella glomerata*.

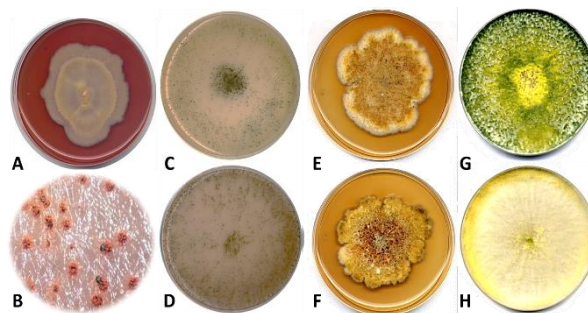


Figura 7. Característiques en cultiu de les soques seleccionades per als assajos *in vitro*. **A, B.** *Arcopilus cupreus* FMR 19716. **B.** Ascomes (cossos fructífers). **C.** *Chaetomium globosum* FMR 19699. **D.** *Chaetomium cochliodes* FMR 19700. **E.** *Epicoccum nigrum* FMR 19857. **F.** *Epicoccum* sp. FMR 19857. **G.** *Trichoderma atroviride* FMR 19306. **H.** *Trichoderma harzianum* FMR 19312. **A-D** Cultius en OA. **E-H.** Cultius en PDA. **A-H.** 14 dies d'incubació a 25 °C.

Tant les soques de *Chaetomium* com d'*A. cupreus* van provocar la inhibició del creixement de *D. glomerata*. Tanmateix, cap d'ells va mostrar una forta inhibició contra *D. seriata* (Fig. 8).

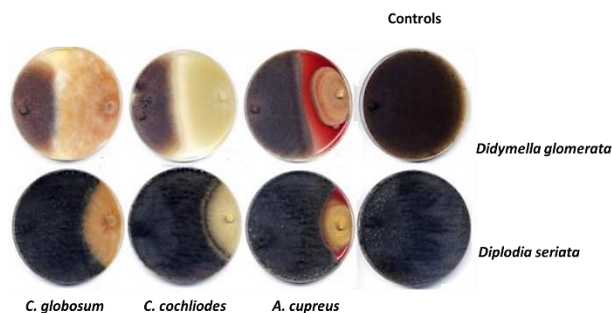


Figura 8. Assajos de cultiu dual als 14 dies d'incubació.

A la Taula 1 es mostren els percentatges d'inhibició del creixement radial (PICR) avaluats als 5, 7 i 14 dies d'incubació. Al cap de 14 dies, *D. glomerata* va mostrar una inhibició del seu creixement de més d'un 40% davant de les espècies de *Chaetomium* assajades. Els valors PICR més alts es van trobar per les soques de *C. cochliodes* i *C. globosum*, 62,67%; no obstant això, *A. cupreus* va exercir un fort efecte fungistàtic provocant un halo sense creixement de 50 mm al cap de 14 dies (Fig. 8). Aquest efecte fungistàtic és degut a la producció de metabòlits secundaris amb efecte inhibidor.

Taula 1. Percentatge d'inhibició del PIRG en cultiu dual. Els resultats apareixen amb el error estàndard per el PICR als 5, 7 i 14 dies d'incubació.

Strains	<i>C. globosum</i>			<i>C. cochliodes</i>			<i>A. cupreus</i>		
	5 th day	7 th day	14 th day	5 th day	7 th day	14 th day	5 th day	7 th day	14 th day
<i>Diplodia seriata</i>	28,72 ± 1,78	38,22 ± 3,08	36,89 ± 5,39	23,59 ± 0,89	35,11 ± 0,77	36,67 ± 0,00	32,89 ± 3,36	32,89 ± 3,36	33,33 ± 0,00
<i>Didymella glomerata</i>	5,55 ± 1,92	34,11 ± 1,34	62,67 ± 0,00	0,00	30,23 ± 0,00	62,67 ± 0,00	0,00	12,40 ± 5,85	47,56 ± 1,54

D'altra banda, les dues soques de *Trichoderma* van mostrar una capacitat d'inhibició del 100% davant dels dos fitopatògens al cap de 14 dies d'incubació en cultiu dual (Taula 2). Tal com s'aprecia a la Figura 9, als 14 dies ambdues espècies de *Trichoderma* van colonitzar tot l'espai del cultiu i creixent per sobre de les colònies dels fongs fitopatògens, tot degradant-ne el miceli. La inhibició sobre *Diplodia seriata* i *Didymella glomerata* es duu a terme per mecanismes de competència i micoparasitisme. En primer lloc, determinat pel ràpid creixement per part dels antagonistes que entren en contacte amb els patògens i posteriorment, per l'evident capacitat de degradar les colònies de *Diplodia seriata* i *Didymella glomerata*. Aquests mecanismes han estat descrits àmpliament gràcies a la capacitat de produir enzims com glucanases, quitinases i proteases que degraden la paret cel·lular (Silva et al. 2019).

Taula 2. Percentatge d'inhibició del creixement radial (PICR) en assaig de cultiu dual de les soques de *Trichoderma* i *Epicoccum*. Els resultats s'expressen com $\pm$ d'error estàndard després de 5, 7 i 14 dies d'incubació. ND: No determinat.

Soques	<i>T. atroviride</i> FMR 19306			<i>T. harzianum</i> FMR 19312		
	Dia 5	Dia 7	Dia 14	Dia 5	Dia 7	Dia 14
<i>Diplodia seriata</i>	76,92 $\pm$ 0,00	84,44 $\pm$ 3,85	100	45,13 $\pm$ 1,78	84,44 $\pm$ 3,85	100
<i>Didymella glomerata</i>	ND	60,47 $\pm$ 4,03	100	52,22 $\pm$ 3,85	66,67 $\pm$ 2,69	100
	<i>Epicoccum cf nigrum</i> FMR 19856			<i>Epicoccum nigrum</i> FMR 19857		
	Dia 5	Dia 7	Dia 14	Dia 5	Dia 7	Dia 14
<i>Diplodia seriata</i>	23,00 $\pm$ 0,00	33,33 $\pm$ 0,00	33,33 $\pm$ 0,00	21,54 $\pm$ 2,66	30,67 $\pm$ 2,31	31,11 $\pm$ 3,85
<i>Didymella glomerata</i>	2,22 $\pm$ 3,85	9,30 $\pm$ 4,03	40,00 $\pm$ 0,00	2,22 $\pm$ 3,85	6,98 $\pm$ 0,00	45,78 $\pm$ 1,54

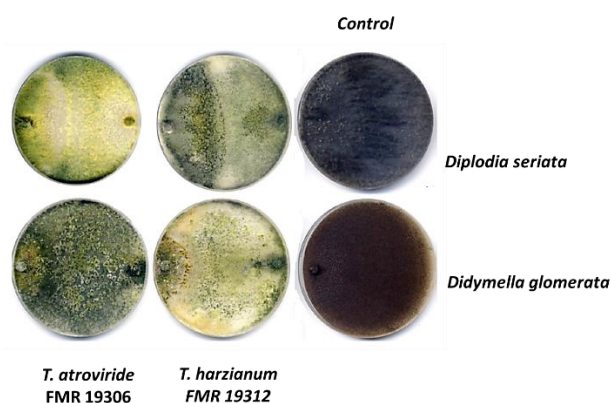


Figura 9. Cultiu dual de les soques de *Trichoderma* als 14 dies d'incubació.

Per altra banda, els resultats de l'assaig pel mètode del cultiu dual de les dues soques d'*Epicoccum* mostren que ambdues tenen relativament poca capacitat d'inhibició enfront *Diplodia seriata*, amb un PICR al voltant del 30% als 14 dies per ambdues (Taula 2). No obstant això, produeixen un efecte fungistàtic sobre *Didymella glomerata* provocant un halo sense creixement al cap de 14 dies (Fig. 10).

És important remarcar que no només les soques seleccionades tenen potencial antagonista contra les malalties criptogàmiques. En aquest sentit, són

necessaris més estudis per avaluar el seu potencial biocontrolador enfront dels patògens de la vinya i l'hort.

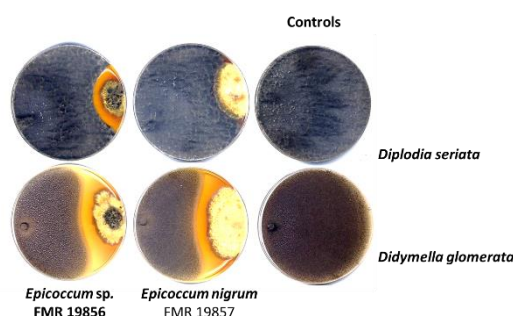


Figura 10. Cultiu dual de les soques de *Epicoccum* als 14 dies d'incubació.

En la micobiota autòctona es troba la solució per lluitar contra les malalties criptogàmiques

Tot i que els microorganismes del sòl són bons candidats per al biocontrol de les malalties criptogàmiques, s'ha de tenir en compte que les interaccions entre els diferents microorganismes no estan del tot estudiades, pel que els fongs antagonistes han de ser estrictament avaluats per entendre les implicacions ecològiques, biològiques i evolutives que podria causar la seva introducció en ambients forans. En la nostra proposta, al tractar-se de micobiota autòctona, els microorganismes es troben ja adaptats a la comunitat microbiana local, de forma que el paper que juguen en l'ecosistema està definit i, a priori, el risc de causar desequilibris que impliquin conseqüències negatives per a la planta o el microbioma estaria minimitzat.

04. Conclusions

L'anàlisi metagenòmic de les mostres de rizosfera de vinya i d'hort ha confirmat que el mètode de cultiu ecològic/biodinàmic millora la resistència de la xarxa microbiana i la capacitat de biocontrol.

Es troben disponibles per a futurs assaigs més de 110 soques fúngiques amb activitat antagonista reconeguda contra diferents fitopatògens que podran ser assajades en futurs projectes amb la participació de més productors ecològics.

Les espècies assajades han demostrat capacitat antagonista a través de diferents mecanismes d'acció: producció de metabòlits inhibidors/fungistàtics, micoparasitisme i competència directa pel substrat. Això fa que siguin uns bons candidats com organismes biocontroladors.

A la micobiota autòctona dels cultius ecològics podem trobar microorganismes que contribueixin a la millora de la qualitat dels sòls deteriorats i a la protecció de les plantes. La seva aplicació com a bioestimulants, antagonistes o com a part dels organismes que reciclen i mantenen la matèria orgànica al terra podria ser part de les estratègies per substituir els productes químics.

05. Referències

- Barelli L et al. 2020. Plant microbiome analysis after *Metarhizium* amendment reveals increases in abundance of plant growth-promoting organisms and maintenance of disease-suppressive soil. *PLoS One* 15: e0231150. doi: 10.1371/journal.pone.0231150.
- Barros DCM et al. 2015. Biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* e do mofo branco em soja usando fungos sapróbios do semi árido nordestino do Brasil. *Summa Phytopathologica* 41 (4): 251–255.
- Christova PK, Slavov SB. 2021. *Epicoccum nigrum* – isolation, characterization and potential for biological control of *Botrytis cinerea*. *Bulg. J. Agric. Sci.* 27 (4): 693–698.
- Cimmino A et al. 2021. Phytotoxins produced by *Didymella glomerata* and *Truncatella angustata*, associated with grapevine trunk diseases (GTDs) in Iran. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1979544>.
- Cobos R et al. 2022. The grapevine microbiome to the rescue: implications for the biocontrol of trunk diseases. *Plants* 11 (7): 840. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11070840>.
- de Almeida AB et al. 2020. Endophytic fungi as potential biological control agents against grapevine trunk diseases in Alentejo region. *Biology* 9 (12): 1–23. <https://doi.org/10.3390/biology9120420>
- Del Frari G. 2019. *Epicoccum layuense* a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine. *PLoS ONE* 14(3): e0213273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213273>
- Descombes CA et al. 2007. Libro blanco de la producción agroalimentaria ecológica en Cataluña. Ed. Generalitat de Catalunya, Departamento d'e Agricultura, Alimentación y Acción Rural. Barcelona. 320 pp.
- Diáñez et al. 2015. *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *Sci Food Agric* 96: 1934–1944. DOI 10.1002/jsfa.7301.
- Díaz GA et al. 2013. Prevalence and pathogenicity of fungi associated with grapevine trunk diseases in Chilean vineyards. *Ciencia e Investigación Agraria* 40 (2): 327–39. <https://doi.org/10.4067/s0718-16202013000200008>.
- Elkhateeb WA i Daba MD. 2022. Insight into secondary metabolites of *Stachybotrys*, *Memnoniella*, *Doratomyces* and *Graphium* between benefits and harmful. *J. Biotechnology and Bioprocessing* 3(1); DOI: 10.31579/2766-2314/066.
- Gobbi A et al. 2022. A global microbiome survey of vineyard soils highlights the microbial dimension of viticultural terroirs. *Communications Biology* 5 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03202-5>.
- Hou LW et al. 2020. The *Phoma*-like Dilemma. *Studies in Mycology*. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.001>.
- Liang H, et al. 2019. Characterizing the Intra-Vineyard Variation of Soil Bacterial and Fungal Communities. *Front. Microbiol.* 10: 1239. doi: 10.3389/fmicb.2019.01239.
- Mayerhofer J. 2017. Assessing effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* on soil microbial communities in *Agriotes* spp. *Biological Pest Control*. FEMS Microbiol Ecol 93 (10): 117. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix117>.
- Mendes da Silva C. 2015. Filtrados de cultivo dos fungos sapróbios *Curvularia inaequalis* e *Stachybotrys globosa* no controle biológico de doenças e na indução de resistência em videiras cvs. Isabel e Cabernet Sauvignon. PhD Thesis. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, 199 pp.
- Mondello V et al. 2018. Grapevine trunk diseases: A review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1181-FE>.
- Perazzolli M et al. 2014. Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00415-14>.
- Pérez JL, Feliu A. 2007. LIFE- Priorat: Manual de técnicas para una viticultura de montaña sostenible. Ed. Fundació Fòrum Ambiental. Barcelona. 88 pp.
- Ribeiro et al. 2018. Bio- and Chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Stachybotrys levispora* and its secondary metabolite griseofulvin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 7627–7632. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04197.
- Silva RN et al. 2019. *Trichoderma*/Pathogen/Plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biology* 123 (8): 565–83. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.06.010>
- Soytong et al. 2021. *Chaetomium* application in agriculture. En.: Technology in agriculture [Internet]. London: IntechOpen; 2021 536 p. <https://www.intechopen.com/books/10454> doi: 10.5772/intechopen.92469.
- Taguam JD et al. 2021. *Epicoccum* species: ubiquitous plant pathogens and effective biological control agents. *European Journal of Plant Pathology* 159 (4): 713–25. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02207-w>.
- Zin N, Badaluddin NA. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture Applications. *Annals of Agricultural Sciences* 65 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.aas.2020.09.003>.

**Iris Sánchez Godino, Daniel Torres García,
Josepa Gené Díaz, José F. Cano Lira, Alberto M.
Stchigel, Dania García Sánchez**
977759341 –
danial.garcias@urv.cat
**Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental
Universitat Rovira i Virgili**

*El projecte ha estat finançat pel Departament
d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural de
la Generalitat de Catalunya a través de l'ajut per
incentivar la recerca aplicada en matèria de
producció agroalimentària ecològica*