



UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI



Generalitat de Catalunya  
Departament d'Acció Climàtica,  
Alimentació i Agenda Rural

## ORGANISMES ANTAGONISTES COM A ALTERNATIVA ALS FUNGICIDES QUÍMICS EN VITICULTURA ECOLÒGICA

Iris Sànchez Godino

### TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA



Tutor acadèmic i professional:  
**Dra. Dania Garcia Sánchez.**  
Professor agregat, Serra Hunter  
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques;  
[daniagarcias@urv.cat](mailto:daniagarcias@urv.cat)

En col·laboració amb el **Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural** de la Generalitat de Catalunya i el celler "**Clos Mogador**" (Gratallops)

7 de Juny de 2022

Jo, Iris Sánchez Godino, amb DNI 39928850-E, sóc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de Juny de 2022



Iris Sánchez Godino

*No hi ha futur sense pagesia*

## AGRAÏMENTS

---

En primer lloc, m'agradaria destacar que aquest treball significa el final d'una etapa de 5 anys. Cinc anys plens d'esforç però també d'aprenentatges, experiències i creixement. Acabar el doble grau amb el present Treball de Fi de Grau és, per a mi, la sort d'un somni vitivinícola que arrenca el seu camí.

Aquest somni està sent possible, en primer lloc, gràcies a la Dra. Dania García. Gràcies per la confiança, la motivació i el sosteniment incansable d'aquests mesos. Gràcies per totes les oportunitats que m'has brindat i per guiar-me dins del món que m'apassiona.

A l'empresa Clos Mogador SL, en Cristian Barbier i tots els seus treballadors, en especial al Dani Terraza, per fer possible el projecte, col·laborar-hi activament, i acollir-nos tant bé a les seves instal·lacions. A René Barbier per plantar la llavor al Priorat i per demostrar que la viticultura es pot alinear de manera holística amb la natura.

A l'Ernest Mas, l'arquitecte dels reptes ecològics i regeneratius de VerdCamp Fruits. Per que ha sigut part d'aquest projecte, pel seu entusiasme i valentia, i per voler canviar el món.

Agraïda també al Dr. Alberto M. Stchigel, per respondre sempre als meus dubtes, per recolzar-me en el treball i per proporcionar-me les soques dels patògens vitícoles, i, per sobre de tot, pel seu bon humor i acollida.

Gràcies als meus companys de laboratori, per ensenyar-me, ajudar-me, integrar-me i per aconsellar-me sempre des del cor: Maria Barnés, Daniel Torres, Taysa Atxi, Viri Magañas, Roberto Monllor i la Dra. Katihuska Paredes.

A les tècnics del laboratori de la Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental, Nuria Pilas i Carme Sanmartí, per la seva feina incansable, per la col·laboració en tot el que he requerit, per la seva amabilitat diària.

A l'Albert Domingo, per la seva motivació i col·laboració en totes les activitats relacionades amb el projecte, i per sempre procurar-nos reptes nous.

A la meva família, que m'ha recolzat al llarg de tota la meva carrera acadèmica, i m'ha permès arribar on jo no arribava durant tots aquests anys: el meu pare Joan i la seva dona Lúdia, la meva germana Ada i el meu cunyat Ioan, i al petit Leonardo per ser-me alegria.

A l'Ernest, per ser-hi sempre, fins i tot quan jo no hi sóc, per fer-me part de les seves vinyes, del seu vi i de la seva vida.

Al Pep i la Teresa, per sostenir-me a la recta final, escoltar-me i fer-me costat, proveir-me de tota la comoditat per treballar, i veure'm sempre capaç.

Al Nil, per les mostres de vinya i la seva amistat. A la Lydia, per ser-me sempre llar i confident. Al David, per ensenyar-me a mirar. A l'Eloi, per fer-me gran.

A la Cooperativa de Barberà de la Conca, per ser-me inici i continuïtat.

Als viticultors incansables que treballen la terra, per més difícil que es torni l'intent.

Als que neden contracorrent en un món que espera fer d'un bàsic un bé. Als que segueixen lluitant per revertir els danys i fer-ho tot més sostenible, però sobretot, més bonic i amb més sentit.

A la vida, per permetre'm donar-li sentit a la meva carrera al peu de les vinyes.

**Gràcies!**

## INDEX

---

INTRODUCCIÓ .....	8
1. El regne Fungi .....	8
1.1. El <i>phylum</i> Ascomycota .....	9
2. Taxonomia fúngica molecular .....	10
3. Les malalties criptogàmiques .....	11
3.1. Tractaments fitosanitaris per a les malalties criptogàmiques .....	11
4. Agents de control biològic com a alternativa per als productes químics .....	13
4.1. El gènere <i>Trichoderma</i> .....	14
4.2. El gènere <i>Epicoccum</i> .....	15
5. Microbiota del sòl.....	17
5.1. Maneig dels cultius.....	19
HIPÒTESI I OBJECTIUS .....	20
METODOLOGIA.....	20
RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	26
1. Aïllament i identificació.....	26
1.1. Identificació fenotípica.....	27
2. Recompte en placa.....	29
3. Anàlisi metagenòmic.....	29
PERSPECTIVES DE FUTUR .....	37
CONCLUSIONS .....	38
AUTOAVALUACIÓ .....	39
BIBLIOGRAFIA.....	40
MATERIAL SUPLEMENTARI.....	50
ANNEX 1. Informe BeCrop de ‘Garnatxa Carretera’ .....	55
ANNEX 2. Informe BeCrop de ‘Bienvenido Carinyena’ .....	63

## DADES DEL CENTRE

---

Aquest Treball de Fi de Grau s'ha desenvolupat a partir de les pràctiques dutes a terme de l'Octubre de 2021 al Maig de 2022, al laboratori de la Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental de la Universitat Rovira i Virgili, en relació amb el projecte "*Organismes antagonistes com a alternativa a la utilització de productes químics contra el mildiu en l'hort i la vinya: una estratègia per impulsar un sistema de producció agrícola sostenible i ecològic.*" (ARP147/21/000021), finançat per la Generalitat de Catalunya.

**Nom del centre:** Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

**Àrea:** Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

**Adreça:** C/ Sant Llorenç, 21. 43201 – Reus

**Cap de departament:** Josep Maria Tomàs Ferré

Dades de contacte: 977759306 / [josepmaria.tomas@urv.cat](mailto:josepmaria.tomas@urv.cat)

**Tutora professional i acadèmica:** Dania Garcia Sánchez

Dades de contacte: 977759341 / [danialgarcias@urv.cat](mailto:danialgarcias@urv.cat)

## RESUM I PARAULES CLAU

---

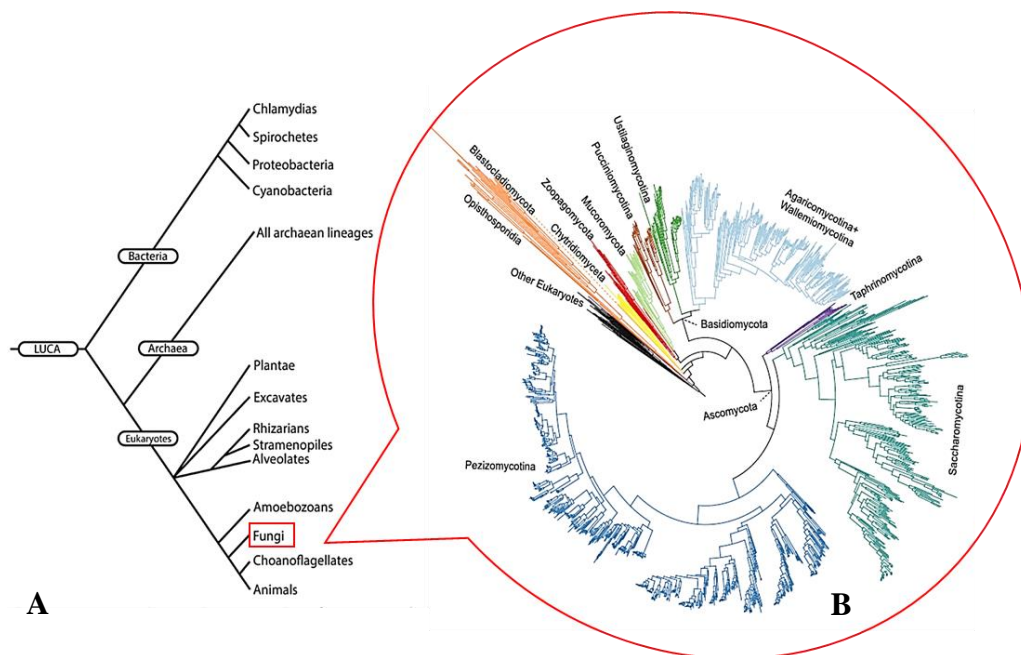
Les malalties criptogàmiques afecten greument als cultius vitícoles i suposen importants pèrdues econòmiques. El principal tractament fitosanitari per controlar aquestes malalties és el coure, no obstant, el seu ús perllongat ha provocat bioacumulació, fitotoxicitat i el deteriorament de l'ecosistema. En aquest sentit, la Comissió Europea n'ha restringit l'ús, pel que és necessari explorar alternatives sostenibles i respectuoses amb el medi ambient. El control biològic utilitzant microorganismes antagonistes és una alternativa que ha demostrat eficàcia amb anterioritat, per això, s'ha plantejat la possibilitat d'aïllar fongs biocontroladors dins dels ecosistemes agrícoles del nostre país, amb l'objectiu de contribuir a la gestió sostenible de les malalties fúngiques. En aquest treball s'han aïllat i identificat 33 soques dels gèneres *Trichoderma* i 3 soques del gènere *Epicoccum* de diferents mostres de cultius de vinya DO Priorat. S'ha avaluat *in vitro*, amb cultius duals, l'activitat antagonista de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* i *Epicoccum nigrum* enfront *Diplodia seriata* i *Didymella glomerata*, agents causals de malalties de la fusta de la vinya. *Trichoderma harzianum* i *T. atroviride* han demostrat un 100% d'inhibició per micoparasitisme enfront ambdós patògens als 14 dies. *Epicoccum nigrum* ha demostrat un 31% d'inhibició enfront *Diplodia seriata* i un 45% a *Didymella glomerata* mitjançant la producció de metabòlits secundaris. L'estudi metagenòmic de dues mostres de rizosfera de vinya amb l'empresa Biome Markers, a través de la plataforma Becrop®, ha confirmat la presència d'agents biocontroladors en el sòl i ha permès determinar que les tècniques biodinàmiques de maneig agrícola afavoreixen la diversitat microbiana i aporten resistència al cultiu. Podem concloure que els ecosistemes vitícoles ecològics son un reservori de fongs antagonistes que resultarien una bona alternativa per al control de les malalties criptogàmiques en el marc d'un nou model agrícola més sostenible, ecològic, i respectuós amb el medi ambient.

**Paraules clau:** control biològic; microbioma; antagonisme; *Trichoderma*; *Epicoccum*

## INTRODUCCIÓ

### 1. El regne Fungi

El regne dels fongs és un dels grups més diversos i antics de microorganismes, en el qual s'estima que existeixen entre 2 i 5 milions d'espècies (Hawksworth et al. 2017). El regne Fungi s'inclou dins el domini Eukarya (**Fig. 1 A**) (Ballen et al. 2017), i actualment, està dividit taxonòmicament en sis subregnes, en els que es distribueixen 12 *phyla* o divisions i més de 200 ordres. Dins el subregne Dikarya s'inclouen els *phylums* Basidiomycota, Ascomycota i Entorrhizomycota, als que pertanyen la gran majoria de fongs descrits fins ara (**Fig. 1 B**) (Li et al. 2021).



**Figura 1.** **A.** Arbre filogenètic arrelat amb l'ancestre comú universal (LUCA), representant les relacions evolutives entre els principals grups taxonòmics Modificat de Ballen et al. 2017. **B.** Filogènia a escala genòmica del Regne dels Fongs basada en 290 gens i 1644 espècies Modificat de Li et al. 2021.

Històricament, els fongs estaven inclosos dins el regne Plantae; tanmateix, no tenen clorofil·la i es distingeixen per característiques estructurals i fisiològiques úniques: paret cel·lular de quitina i glucans i membrana cel·lular amb ergosterol. Aquestes característiques van promoure la separació dels fongs de les plantes.

Els fongs són heteròtrofs i tenen una nutrició absorptiva, la qual els posiciona estratègicament en la natura dins dels cicles de nitrogen i carboni i els aporta gran capacitat de colonitzar substrats molt diferents. Els fongs constitueixen un grup d'organismes molt variat i es troben pràcticament a qualsevol nínxol ecològic, terrestre o aquàtic, i es consideren organismes ubics i cosmopolites (Cepero de García et al. 2012).

El tal·lus o soma dels fongs pot ser unicel·lular, com és el cas dels llevats, o pluricel·lular. Els fongs pluricel·lulars estan formats per filaments tubulars denominats hifes, pel que s'anomenen fongs filamentosos. El conjunt de les hifes s'anomena miceli. Alguns poden presentar ambdós tipus de fenotips, tant unicel·lular com filamentós, i s'anomenen fongs dimòrfics, entre els que es troben moltes espècies patògenes tant per l'ésser humà com pels animals (Sil et al. 2015).

Els fongs poden presentar dos tipus de reproducció: sexual i asexual. Alguns poden reproduir-se de les dues formes mentre que d'altres només se'n coneix una de les dues. La fase sexual es denomina teleomorf, mentre que l'asexual correspon a l'anamorf. L'organisme en totes les seves formes i fases es coneix com holomorf.

Asexualment, els fongs es poden reproduir per fissió, gemmació o esporulació. La fissió i la gemmació són pròpies dels llevats, mentre que l'esporulació és pròpia dels fongs filamentosos. L'esporulació consisteix en la formació d'espores asexuals mitjançant mitosis, anomenades genèricament mitòspores. Pels membres del subregne Dikarya, les mitòspores s'anomenen conidis. Els conidis es dispersen per l'aigua, el vent o a través dels animals, i són els responsables de la formació d'un gran nombre de propàguls, permetent una disseminació eficient i la colonització dels substrats.

La reproducció sexual implica la recombinació genètica que origina nous genotips i permet una ràpida adaptació dels fongs en resposta a les condicions canviants del medi. Que un fong es reproduïxi de forma sexual o asexual depèn de les condicions externes: la reproducció sexual està regulada per factors ambientals, nutricionals i genètics i en molts individus s'esdevé quan les condicions són desfavorables per a la supervivència. Aquest procés resulta en la formació d'espores sexuals haploides. Els propàguls d'origen sexual generalment tenen parets gruixudes i pigmentades, pel que actuen, a més, com a formes de resistència que poden romandre llargs períodes de temps en estat de latència (Cepero de García et al. 2012).

### **1.1. El *phylum* Ascomycota**

Els ascomicets són els fongs més abundants i diversos del regne Fungi. El nom d'aquest *phylum* prové de les estructures sexuals formades per aquests fongs, anomenats 'asc's' (del grec antic ἄσκός - *askós*). Els asc's generalment es formen en l'interior dels cossos fructífers, els quals s'anomenen ascocarps o ascomes. Dins els asc's es formen les espores sexuals, denominades ascòspores. A més de la reproducció sexual, els ascomicets poden

reproduir-se asexualment mitjançant la formació de conidis. La gran diversitat de formes i estructures pròpies d'aquest grup de fongs, i, especialment, les diferències morfològiques entre les formes sexuals i asexuals, va donar lloc a una nomenclatura dual, on l'anamorfi i el teleomorfi rebien un nom científic diferent. És el cas, per exemple, del gènere *Trichoderma*, els estats sexuals del qual es van descriure dins el gènere *Hypocrea*.

## 2. Taxonomia fúngica molecular

Històricament, els fongs s'han identificat i classificat per les seves característiques fenotípiques i fisiològiques. Ens els últims anys, els organismes s'han reclassificat filogenèticament gràcies al desenvolupament de la biologia molecular i les tècniques de seqüenciació d'ADN. Això ha permès caracteritzar com a holomorfs moltes espècies de les quals les seves fases sexuals i asexuals estaven descrites de forma independent (Fajarningsih 2016; Cepero de García et al. 2012).

Per a la identificació fúngica a nivell molecular, un dels mètodes que més s'utilitzen és el *DNA barcoding*. Aquest mètode utilitza regions d'ADN anomenades *barcodes* o codis de barres com a patrons únics per a la identificació i classificació dels éssers vius. Idealment, els *barcodes* han de ser regions curtes i estandarditzades, i ser les mateixes per a tots els regnes, amb seqüència única per a cada espècie, constants dins la mateixa espècie, i variables per permetre distingir entre espècies diferents, encara que siguin properes filogenèticament (Fajarningsih 2016).

Una de les regions més utilitzades per a la identificació molecular dels fongs és el cistron nuclear de l'ARN ribosòmic, el qual inclou els gens 18S, 5.8S i 28S i dues regions intergèniques conegudes com *Internal Transcribed Spacers* anomenades ITS1 i ITS2 (**Fig. 2**). El gen 18S correspon a la subunitat petita de l'ARN ribosòmic (*nuclear ribosomal small subunit*, SSU) i la 28S a la subunitat gran (*nuclear ribosomal large subunit*, LSU). Els loci LSU i SSU s'han estudiat com a *barcodes* però han demostrat ser regions massa conservades per a permetre la identificació a nivell d'espècie. La regió ITS és una seqüència no codificant altament polimòrfica i permet distingir tant espècies conegudes com noves, pel que ha sigut designada com el *barcode* de referència per a la identificació fúngica. No obstant, no aporta suficient informació en alguns gèneres fúngics, pel que s'ha d'incloure la seqüenciació d'altres marcadors moleculars o *barcodes* secundaris (Schoch et al. 2012). Alguns exemples de marcadors secundaris són el gen de la  $\beta$ -tubulina (*tub2*) i la subunitat II de la polimerasa ribosomal (*second largest subunit of*

*ribosomal polymerase II, rpb2*). L'*rpb2* s'ha proposat com el marcador molecular alternatiu per a moltes espècies de fongs, ja que permet distingir millor entre taxes filogenèticament properes (Větrovský et al. 2016).



**Figura 2.** Esquema del cistron nuclear de l'ARN ribosòmic. Modificat de Fajarningsih 2016.

### 3. Les malalties criptogàmiques

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 (McCarthy et al. 2017). Tant els fongs com els oomicets formen espores que perduren al sòl en estat latent durant llargs períodes de temps, i tenen una gran capacitat de propagació. Quan les condicions de temperatura i humitat són favorables, aquestes espores s'activen causant infeccions primàries, pel que causen danys devastadors i grans pèrdues econòmiques.

Les malalties criptogàmiques inclouen un ampli rang d'afectacions. Per exemple, a fulles i fruits *Botrytis cinerea* causa la podridura grisa (Williamson et al. 2007). A la vinya l'agent causal del mildiu és l'oomicet *Plasmopara viticola* i causa greus problemàtiques. A Catalunya, l'any 2020, el mildiu va causar fins a un 70% de pèrdua de producció per a molts viticultors, especialment productors ecològics (Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya, Núm. 8229 - 21.9.2020). Per altra banda, altres fongs causen 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, qualitat i longevitat dels cultius (Díaz et al. 2013) i els agents causals inclouen organismes com *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).

#### 3.1. Tractaments fitosanitaris per a les malalties criptogàmiques

Antigament, les malalties criptogàmiques en l'agricultura es prevenien o tractaven amb productes naturals. Fins l'any 1940, els fungicides estaven basats en químics inorgànics sintètics, majoritàriament a base de coure i sofre i sovint preparats pels mateixos usuaris.

Aquests productes necessitaven dosis molt altes, entre 10 i 20 kg per hectàrea, i aplicacions freqüents, però no sempre eren efectius i sovint provocaven fitotoxicitat. A mitjans del segle XX es van introduir fungicides orgànics moderns més actius que es podien administrar en dosis menors (d'1,5 a 3 kg per hectàrea), però van resultar altament tòxics i alguns patògens hi van esdevenir resistents (Conway 2020; Tudi et al. 2021). Tanmateix, els fitosanitaris inorgànics com el coure i el sofre s'han mantingut fins a l'actualitat, ja que són altament eficaços com a fungicides.

L'ús i l'abús dels productes químics en l'agricultura comporta grans riscos tant per a la salut ambiental com per la humana. Els pesticides persisteixen en l'ambient, provocant bioacumulació, toxicitat i contaminació dels ecosistemes. A més, poden ser metabolitzats o degradats i donar lloc a molècules més mòbils i tòxiques que el producte original. Aquests contaminants persisteixen al sòl i poden migrar a noves zones a través de l'aire i l'aigua (Tudi et al. 2021), exposant finalment a la població general als residus, ja sigui a través de l'aigua, l'aire o els aliments (Bernardes et al. 2015). Per una altra banda, els fungicides no només actuen sobre els microorganismes diana: poden afectar a insectes, animals, les pròpies plantes (Tudi et al. 2021), i als fongs que són beneficiosos per als cultius, resultant en la pèrdua de biodiversitat, funcionalitat i resiliència dels sòls de conreu (Duke 2018; Keiblinger et al. 2018) i exercint una pressió biològica que afavoreix la selecció d'organismes resistents, provocant finalment la persistència dels fitopatògens altament virulents (Fisher et al. 2012). Alguns d'aquests fitopatògens han creuat les barreres interespecie, causant infeccions en humans i suposant un greu risc per a la salut (Silva et al. 2019; Gauthier et al. 2013).

Els fongs juguen papers clau en els cicles dels nutrients al sòl i són importants per a la retenció de carboni. L'afectació de les poblacions fúngiques condueix a la pèrdua de matèria orgànica al sòl, un factor associat amb el canvi climàtic i l'efecte hivernacle (Gougoulas et al. 2014). A més, factors associats al canvi climàtic -com l'increment de la temperatura i el canvi en els patrons pluvials-, han resultat en l'increment de l'ús de pesticides i la contaminació associada (Tudi et al. 2021), de forma que el model de gestió afecta de forma especialment negativa al medi ambient.

Per tots aquests motius, hi ha una preocupació política i social creixent en relació a l'ús dels productes químics per a l'agricultura, que ha derivat en la creació del 'Pacte Verd Europeu', un recull d'intencions de la Unió Europea en què s'incentiva la creació d'un

sistema alimentari saludable i respectuós amb el medi ambient. En aquest document es planteja l'objectiu de reduir en un 50% l'ús de productes químics en l'agricultura abans de l'any 2030 i fomenta el model de l'agricultura ecològica com a solució per a la sostenibilitat del sistema agrari (Comision Europea COM2019 640 final).

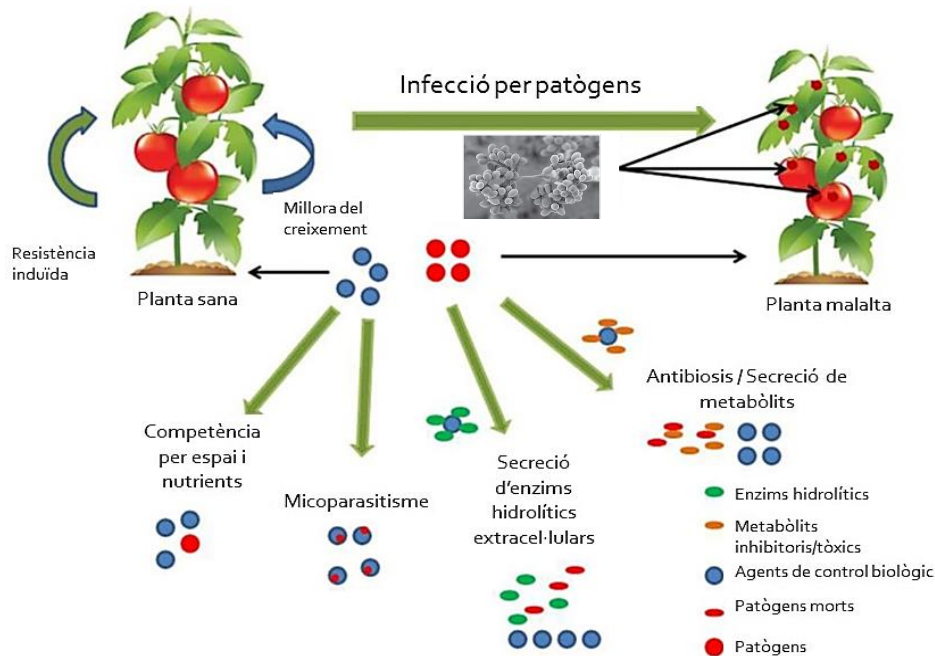
No obstant, l'agricultura ecològica utilitza com a principal fungicida i bactericida el brou bordelès, un producte basat en coure. Tradicionalment, els fungicides preventius basats en coure han sigut considerats respectuosos amb el medi ambient degut a que el seu principi actiu existeix de forma natural en els ecosistemes (Pérez et al. 2007), però el seu ús freqüent com a fungicida foliar ha provocat l'acumulació de coure en el sòl. Com a conseqüència ha provocat contaminació dels sòls afectant directament l'equilibri en la microbiota i, en conseqüència, els processos de reciclatge de nutrients i la fertilitat del sòl (Komárek et al. 2010; Wightwick et al. 2008). És necessari, per tant, trobar alternatives als compostos de coure que siguin eficients per als tractaments dels cultius ecològics i que no interfereixin amb la microbiota beneficiosa de la interfície sòl-planta. En aquest sentit, la Comissió Europea analitza la introducció de nous bioproductes per a la protecció vegetal, per dissenyar un sistema de producció ecològica i sostenible (Comision Europea COM2020 381 final). Alguns productes ja aprovats a Europa son el Binab-T®, basat en dues soques de *Trichoderma*, o el Bethirul, basat en *Bacillus thuringensis*.

#### **4. Agents de control biològic com a alternativa per als productes químics**

El control biològic es defineix com la reducció de la quantitat o l'activitat d'un patogen en el seu estat actiu o dorment, per part d'un o més microorganismes (Arya et al. 2010). Aquests microorganismes s'anomenen agents de control biològic (BCAs, de l'anglès *Biological Control Agents*) o antagonistes i conformen una alternativa prometedora alternativa a l'ús de productes químics en l'agricultura. Normalment, els antagonistes són microorganismes aïllats de la filosfera (microambient de la fulla) o la rizosfera (microambient del sòl influenciat per les arrels de la planta) que poden controlar els fitopatògens. Els BCAs són capaços d'establir-se l'ecosistema, reproduir-se i colonitzar la filosfera i/o la rizosfera (Silva et al. 2019), de forma que el seu efecte és molt més perllongat que l'aplicació de fungicides químics i són compatibles amb el nou model d'agricultura en desenvolupament.

Els BCAs duen a terme el biocontrol a través de diversos mecanismes, ja siguin directes o indirectes (**Fig. 3**). Els mecanismes directes inclouen la secreció de metabòlits

(antibiòtics o antifúngics: antibiosis), la secreció d'enzims extracel·lulars i el micoparasitisme, on l'antagonista extreu nutrients directament del fong hoste. Els mecanismes indirectes inclouen la competència, la promoció del creixement vegetal i la inducció de la resposta immune vegetal (resistència induïda) (Thambugala et al. 2020).



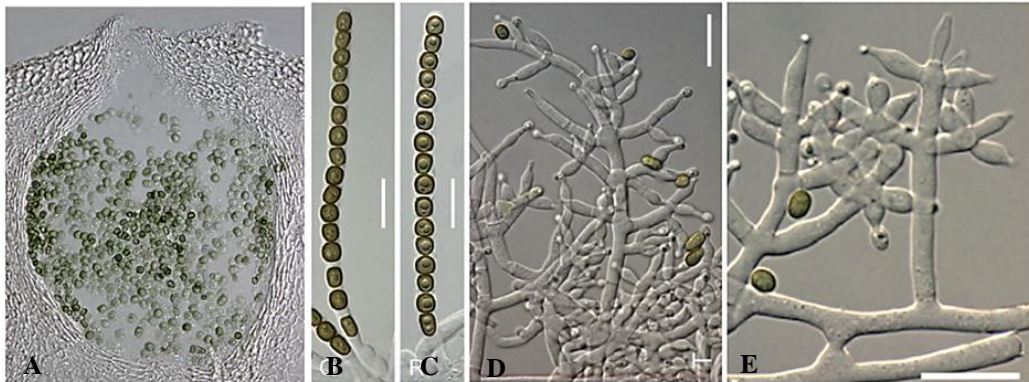
**Figura 3.** Mecanismes clau d'acció involucrats en el control biològic per part dels fongs antagonistes en les malalties de les plantes. Modificat de Thambugala et al. 2020.

Els fongs són microorganismes especialment interessants com BCAs degut a la ràpida i massiva reproducció, la 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*, *Talaromyces*, i *Trichoderma* (Arya et al. 2010). Un antagonista especialment destacable per la seva diversitat de mecanismes d'acció contra les malalties criptogàmiques són les espècies del gènere *Trichoderma* (Adnan et al. 2019; Thambugala et al. 2020).

#### 4.1. El gènere *Trichoderma*

*Trichoderma* és un gènere que pertany a la família Hypocreaceae, dins de l'ordre dels Hypocreales (Pezizomycitina, Ascomycota). Els estats sexuals es van identificar inicialment en el gènere *Hypocrea*, però actualment, amb l'abandonament de la nomenclatura dual, el nom acceptat per a l'holomorf és *Trichoderma* (Fig. 4). A dia d'avui, al gènere se li atribueixen 493 representants segons l'*Index Fungorum*, però no

totes les espècies han estat seqüenciades o estan disponibles a la base de dades del GenBank (Adnan et al. 2019).



**Figura 4.** *Trichoderma cremeoides*. **A.** Cos sexual. **B–C.** Ascs i ascospores. **D–E.** Conidiòfors i fiàlides (formes asexuals). Adaptat de Jaklitsch et al. 2015.

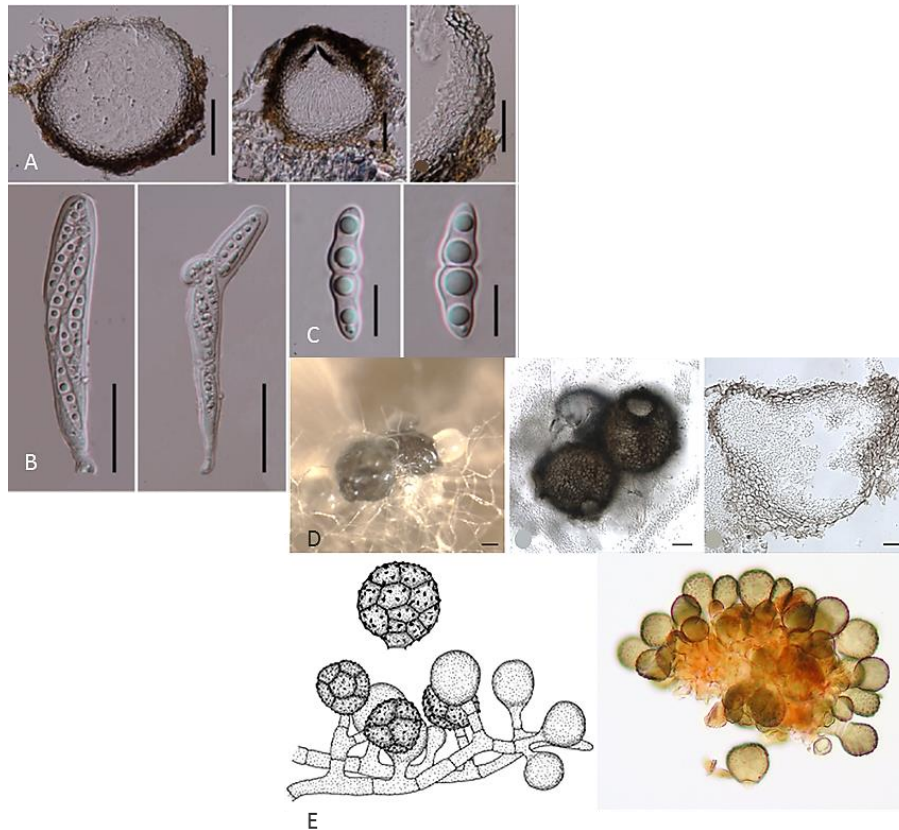
Les espècies de *Trichoderma* poden ser biotròfiques, -viuen de nutrients obtinguts d'hostes vius durant llargs períodes i no produeixen toxines-, hemibiotròfiques -patògens que combinen el biotrofisme amb etapes en que generen metabòlits secundaris i maten l'hoste-, sapròfites -extreuen els nutrients de matèria orgànica en descomposició- o hipersapròfites de plantes o altres fongs (Maharachchikumbura et al. 2016). Generalment, es troben en la rizosfera o són endòfites de les plantes, amb les quals estableixen relacions mutualistes (Adnan et al. 2019).

*Trichoderma* és un gènere amb una alta diversitat, que es pot trobar en tot tipus de sòls i climes arreu del món, colonitzant diversos tipus de nínxols ecològics i suprimint la població d'altres microorganismes competitiu (Adnan et al. 2019). El conjunt d'aquests factors converteixen a *Trichoderma* en un gran agent de biocontrol local, actuant a través de mecanismes tant directes com indirectes. És considerat l'antagonista amb major potencial: *Trichoderma harzianum* és l'agent de control biològic més comú i s'ha utilitzat comercialment contra malalties fúngiques en diferents cultius. Entre els productes desenvolupats presents al mercat trobem RootShield® (BioWorks, Inc., USA), basat en *T. harzianum* i utilitzat contra fitopatògens com *Fusarium* i *Thielaviopsis* i Soilgard® basat en *T. virens* i útil contra patògens del terra com *Rhizoctonia* o *Phythium* (Thambugala et al. 2020).

#### 4.2. El gènere *Epicoccum*

*Epicoccum* és un gènere fúngic inclòs en la família Didymellaceae, de l'ordre Pleosporales (Dothideomycetes, Ascomycota). Fins ara, 162 noms d'espècies s'han

inclòs dins aquest gènere a l'*Index Fungorum*, no obstant, no totes les espècies estan validades.



**Figura 5.** *Epicoccum* spp. **A – C.** Forma sexual *Epicoccum mackenziei*. **A.** Ascomes. **B.** Ascs. **C.** Ascòspores. **D, E.** Sinamorfs (diferents formes asexuals) **D.** Picnidis d'*Epicoccum viticis*. **E.** Conidis i esporodoqui d'*Epicoccum nigrum*. Adaptat de Jayasiri et al. 2017 i Chen et al. 2015.

La forma sexual del gènere *Epicoccum* només ha estat descrita per a l'espècie *Epicoccum mackenziei*, i es caracteritza per presentar ascomes ostiolats i ascs amb 8 ascospores hialines (**Fig. 5 A-C**). Pel que fa a la morfologia asexual, s'han descrit dos sinamorfs, és a dir, dos morfotipus diferents d'estats asexuals. Una es caracteritza per formar cossos fructífers denominats conidiomes, a l'interior dels quals es desenvolupen cèl·lules conidiògenes i conidis hialins i unicel·lulars (**Fig. 5 D**). L'altra tipologia de cos asexual característica d'*E. nigrum*, l'espècie tipus del gènere, està determinada per un sinamorf amb cos fructífer de tipus esporodoqui, al qual es produeixen conidis pluricel·lulars, anomenats fragmoconidis, amb septes foscos i parets verrucoses (**Fig. 5 E**) (Jayasiri et al. 2017; Chen et al. 2017; 2015).

*Epicoccum* es troba majoritàriament associat a plantes com a endòfit (Hou et al. 2020). És habitual aïllar-lo de la fusta de la vinya, tant de material sa com material infectat per

GTDs (Del Frari et al. 2019) i algunes espècies també han estat aïllades de la filosfera de fruits i fulles de la vinya (González et al. 2011). No obstant, s'han descrit espècies sapròfites i algunes de fitopatògenes. Algunes s'han descrit com BCAs, entre les quals destaca *E. nigrum* (Taguiam et al. 2021; Koledenkova et al. 2022). No obstant, es creu que diverses espècies s'han identificat erròniament com a *E. nigrum* i caldria reclassificar-les taxonòmicament (de Fávoro et al. 2011). Els mecanismes d'acció d'*Epicoccum* com a controlador biològic són l'antagonisme directe, la producció de metabòlits secundaris i la inducció de la resistència vegetal (Taguiam et al. 2021).

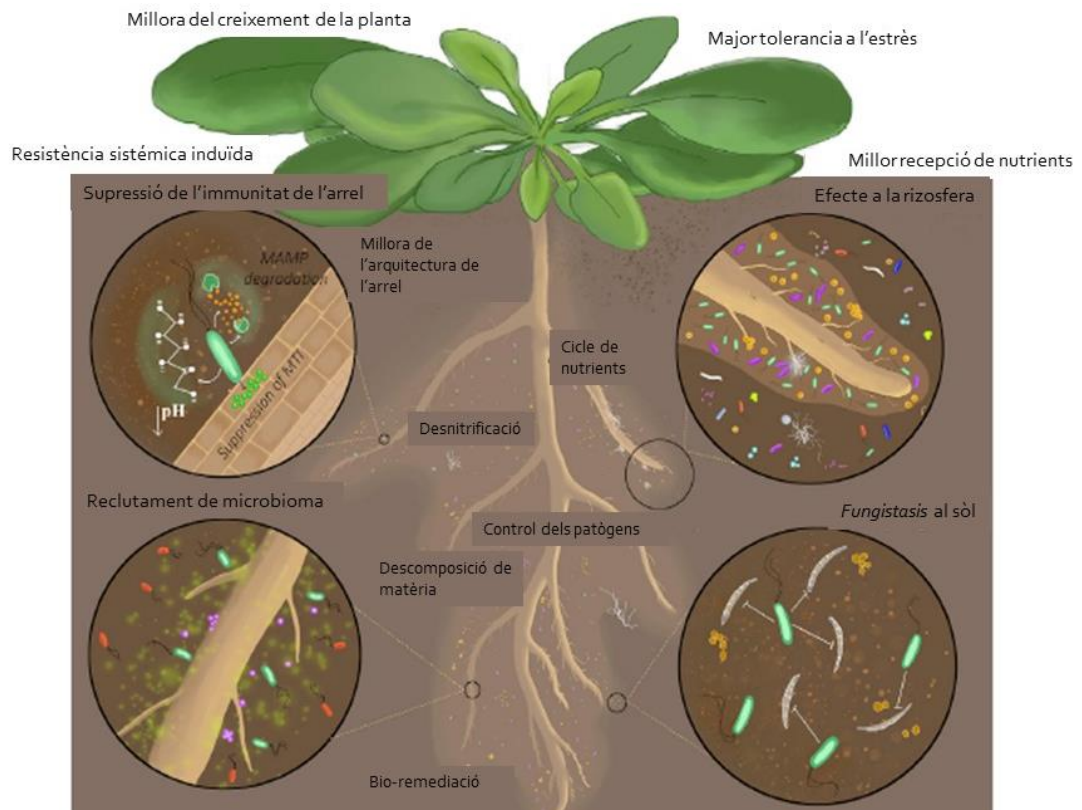
## 5. Microbiota del sòl

La microbiota del sòl juga un paper crucial en l'ecosistema dels cultius. Els microorganismes interaccionen amb les plantes de forma directa i contribueixen en moltes de les seves funcions, com metabolitzar els nutrients del sòl en formes assimilables per les plantes, promoure el seu creixement o aportar resistència a la planta enfront els patògens i plagues (**Fig. 6**) (Bakker et al. 2020). En aquest sentit, és important tenir en compte l'estat del microbioma del sòl i la rizosfera per afavorir la salut del cultiu. De fet, l'equilibri de la microbiota i una alta diversitat afavoreixen la resistència del sòl davant les pertorbacions biòtiques i abiòtiques (Ortiz-Álvarez et al. 2021).

Per conèixer l'estat microbiològic del terra i la seva biodiversitat no és suficient amb el cultiu en placa tradicional dels microorganismes, ja que molts d'ells no són cultivables *in vitro* o els resulta competitivament desfavorable. Les tècniques de seqüenciació massiva han permès l'estudi de la diversitat microbiana a partir de l'estudi de les seqüències de nucleòtids dels organismes d'una mostra complexa. Aquest mètode permet estudiar la microbiota del terra en el seu conjunt, obtenint molta més informació de la que es pot obtenir amb els mètodes tradicionals.

A més de la diversitat dels microorganismes, és important conèixer les seves interaccions i funcionalitat. L'empresa Biome Makers ha desenvolupat la tecnologia BeCrop®. Els anàlisis de BeCrop® es basen en la seqüenciació massiva de les regions 16S i ITS de l'ARN ribosòmic (rRNA) de les mostres de terra. Amb aquesta informació, proporcionen informes intuïtius sobre la biodiversitat, funcionalitat, qualitat i resistència del cultiu en relació amb la microbiota que hi habita. També aporten informació completa sobre la diversitat microbiana autòctona de cada cultiu, tant de bacteris com de fongs. Aquesta tecnologia permet guanyar una visió global de l'ecosistema i fer comparacions entre

diferents mostres i estudiar les conseqüències de variacions en les tècniques de maneig dels cultius.



**Figura 6.** Conceptes clau en les interaccions planta-microbioma. Modificat de Bakker et al. 2020.

Cada ecosistema té la seva pròpia composició i dinàmica, i les espècies que hi habiten interaccionen entre elles i amb l'entorn a través dels cicles dels nutrients i els fluxos d'energia. 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. És important, per tant, que a més de ser capaços de controlar els fitopatògens, els antagonistes no tinguin efectes no desitjats sobre el cultiu o el sòl. En aquest sentit, no es pot descartar que els microorganismes introduïts puguin esdevenir espècies invasores o patògens emergents per al cultiu i causar danys irreparables (He et al. 2021).

Per una altra banda, 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. La majoria dels microorganismes són sensibles als factors abiòtics com ara la corrent de l'aire, el pH i la llum ultraviolada, la manca de recursos i a la competència

amb altres organismes. Aquestes interaccions competitives predominen a les comunitats naturals (Ghoul et al. 2016). Per una altra banda, les comunitats residents no s'acostumen a veure 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 entomopatògens o antagonistes de patògens vegetals (Kröber 2014; Mayerhofer et al. 2017; Perazzolli et al. 2014).

Per evitar aquestes possibles problemàtiques, és important estudiar detingudament les interaccions abans de desenvolupar comercialment i/o aplicar un bioproducte. Una estratègia interessant és la cerca de microorganismes antagonistes propis de l'ecosistema: l'ús de la microbiota autòctona minimitza el risc de desequilibri de la microbiota del sistema alhora que maximitza la probabilitat d'acció del producte, ja que els microorganismes presents a l'ecosistema del cultiu estan millor adaptats a les condicions d'aquest ecosistema i tenen més probabilitat d'èxit per establir-se al terra com a simbionts i per exercir l'activitat biocontroladora enfront els patògens.

Per tant, l'aïllament i ús d'aquests biocontroladors autòctons per al control de les malalties criptogàmiques ofereix una alternativa ecològica, sostenible i respectuosa amb els ecosistemes agrícoles a l'ús de químics sintètics actuals.

### **5.1. Maneig dels cultius**

La microbiota del sòl es veu fortament influenciada pel maneig agronòmic del cultiu. L'agricultura convencional no només fa ús de pesticides químics (insecticides, fertilitzants, fungicides, etc.), sinó que també llaura la terra, causant erosió del sòl. En conjunt, aquesta metodologia afecta la xarxa microbiana, minvant-la i desequilibrant-la.

L'agricultura ecològica o orgànica està regulada a nivell Europeu i es basa en l'ús d'energies renovables, el reciclatge de productes d'origen vegetal i animal, la millora de la fertilitat del sol i la prevenció de l'erosió (Consell Regulador Europeu EC No. 834/2007; Consell Regulador Europeu EC No. 2021/1165). Per una altra banda, el maneig biodinàmic és una metodologia ecològica no regulada que considera el conjunt de l'explotació agrícola com un organisme viu. L'agricultura biodinàmica es caracteritza per no utilitzar productes químics, no llaurar la terra, mantenir coberta vegetal i fertilitzar el terreny de forma natural mitjançant compostatges i la integració d'animals, seguint els requisits de la certificació descrita per l'associació Demeter (<https://www.demeter-usa.org>) (Maioli et al. 2021). Ortiz-Álvarez i col·laboradors (2021) demostren al seu

estudi que un maneig biodinàmic en els cultius de vinya beneficia a l'ecosistema microbià, especialment reforçant la comunitat fúngica i equilibrant la microbiota. El maneig convencional, en canvi, propicia un major desequilibri de la comunitat microbiana i una menor resistència a les pertorbacions.

## HIPÒTESI I OBJECTIUS

---

Es planteja la hipòtesi de que dins la microbiota autòctona dels cultius ecològics existeixen microorganismes amb activitat antagonista contra els principals fitopatògens del cultiu de la vinya.

Aquest treball té com objectiu orgànic principal contribuir en el procés de transformació del model de producció agrícola en un de més sostenible, avançant en el desenvolupament de solucions de control fitosanitari per aportar solucions eficients i respectuoses amb el medi ambient en el marc de la producció agrícola ecològica i regenerativa, en concordança amb els objectius del Pacte Verd Europeu.

Per donar consecució a l'anterior desenvoluparem els següents objectius operatius:

- Aïllar i identificar fongs presents en el sòl i la rizosfera de cultius vitícoles amb activitat antagonista contra els fongs fitopatògens de la vinya.
- Avaluar la seva activitat *in vitro* contra alguns del fitopatògens propis de la vinya.
- Obtenir informació de l'estat microbiològic del sòl mitjançant tècniques de metagenòmica.
- Inferir la importància de la microbiota fúngica i la seva relació amb el maneig dels cultius i l'aplicació de productes químics.

20

## METODOLOGIA

---

### 1. Mostreig

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). Es van utilitzar bosses de plàstic per recollir terra procedent tant del sòl com de la rizosfera de diferents punts dels cultius vitivinícoles. També es van prendre mostres de diferents composts i de teixits vegetals presumptament infectats per malalties criptogàmiques.

## 2. Sembra de les mostres

Les mostres de terra es van homogeneïtzar manualment dins dels mateixos contenidors. 1 gram de terra es va dissoldre en 10 ml d'aigua destil·lada estèril. Cadascuna d'aquestes mostres es va distribuir de forma equivalent en 4 plaques de Petri de 90 mm de diàmetre, buides i estèrils. La meitat de les plaques de cada mostra es van mesclar amb agar *dichloran rose-bengal-chloramphenicol* (DRBC; 5 g peptona, 10 g glucosa, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4$ , 25 mg Rose Bengal, 100 mg cloramfenicol, 20 g agar, 1 L aigua destil·lada) i l'altra meitat amb *potato carrot agar* (PCA; 20 g patata, 20 g pastanaga, 13 g agar, 1 L aigua destil·lada, 5 ml cloramfenicol), en estat líquid a 45 °C. Ambdós medis es van suplementar amb cloramfenicol, un antibiòtic per evitar el creixement de bacteris al cultiu, i 5 gotes de dieldrina, un insecticida que evita el desenvolupament dels àcars. Un cop solidificats, els cultius es van incubar en diferents condicions: la meitat de les plaques es van incubar a 15 °C mentre que les rèpliques es van incubar a 25 °C, de 4 a 5 setmanes. Les plaques es van revisar visualment sota la lupa binocular cada setmana.

## 3. Dilucions seriades i recompte

Per una altra banda, 1 g de terra es va dissoldre en 10 mL d'aigua destil·lada estèril i se'n van fer dilucions seriades fins a una concentració de  $1 \cdot 10^{-3}$ . 100 µl de la dilució es van sembrar en superfície amb ajuda d'una nansa Drigalsky sobre agar DRBC i agar PCA. Les plaques es van incubar a 25 °C de 4 a 5 setmanes i es van utilitzar per fer el recompte de colònies totals (Unitats Formadores de Colònies per gram, UFC/g). Es van dur a terme dues rèpliques per cada medi de cultiu.

## 4. 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 resuspendre 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 PCA, de les quals una de cada medi de cultiu es va incubar a 15 °C i 25 °C, seguint el mateix protocol que al [punt 2](#).

## 5. 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 ajuda d'un bisturí i es van sembrar en superfície en plaques de *synthetic nutrient-poor agar* (SNA; 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{KNO}_3$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{KCl}$ , 0,2 g glucosa, 0,2 g sacarosa, 14 g agar, 1 L aigua destil·lada). Paral·lelament, part de les mostres es van incubar en cambra humida, un mètode senzill 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.

## 6. Aïllament fúngic

Amb l'objectiu d'obtenir cultius purs d'aquells fongs procedents tant de les mostres de terra com dels teixits vegetals, es van recollir conidis o es va tocar un petit fragment de colònies aïllades de les soques d'interès amb una agulla estèril i es van transferir a les plaques de Petri de 55 mm de diàmetre de diferents medis de cultiu segons el gènere fúngic. Els medis d'elecció van ser PCA per a la majoria d'aïllats, i *oatmeal agar* (OA; 30 g farina de civada, 13 g agar, 1 L aigua destil·lada) per altres gèneres que formen estructures de reproducció sexual. Totes les plaques es van incubar a 25 °C en obscuritat de 5 a 14 dies.

## 7. Col·lecció de treball i conservació de les soques

Un cop obtinguts 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 *potato dextrose agar* (PDA; Pronadisa, Madrid Spain) 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).

## 8. Identificació fenotípica

La caracterització fenotípica presumptiva es va dur a terme mitjançant la observació de les colònies tant a ull nu com sota la lupa binocular en els diferents medis. Per a la visualització microscòpica i la captura d'imatges, es van realitzar microcultius en agar PDA i es van muntar els cobreobjectes sobre solució *Shears* (3 g acetat de potassi, 150 mL aigua destil·lada, 60 mL glicerina, 90 mL etanol al 95%) i blau de lactofenol (10 g àcid làctic, 20 g fenol, 40 g glicerol, 20 mL aigua destil·lada) al cap de 5 dies d'incubació a 25°C.

## 9. Extracció d'ADN, amplificació i electroforesi

Els aïllats es van sembrar en agar PDA i es van incubar de 5 a 7 dies a 25 °C en obscuritat. L'extracció d'ADN es va realitzar amb el kit comercial "FastDNA kit" (MP Biomedicals, Thermo Fischer Scientific Inc., Massachussets, USA). La concentració d'ADN (mesurada en ng/μl) i la qualitat final (Densitat òptica a 260 nm entre densitat òptica a 280nm, A260/280) de l'ADN de l'extracte es va quantificar instrumentalment amb l'equip espectrofotomètric NanoDrop 2000 (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific Inc., Massachussets, USA) (**Material suplementari, Fig. 1s**). Els extractes es van diluir a una concentració d'ADN final de 30 ng/μl. Es va realitzar l'amplificació per PCR de marcadors moleculars específics d'ADN (*barcodes*) per a la filogènia de cada família i gènere fúngic, fent ús d'encebadors o *primers* específics, tal com es recull a la **Taula 1**.

La *master mix* per a la PCR es va preparar en condicions asèptiques amb els components del kit EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japó), seguint el model recollit a la **Taula 2**. L'EmeraldAmp és una premix a 2X que conté tampó de reacció optimitzat, dNTPs, l'ADN polimerasa, un reactiu de densitat i un colorant verd, de forma que per a fer la *master mix* només és necessari afegir els *primers*, l'ADN motlle (mostra) i l'aigua, que també proporciona el kit. Les condicions de la PCR per a cada marcador es recullen a la **Taula 3**.

**Taula 1.** *Barcodes* utilitzats i seqüència dels primers. ITS: *Internal Transcribed Spacer*; *rpb2*: *RNA polymerase II 2nd largest subunit*; *tub2*: *tubulin beta chain*.

Locus	Primer	Direcció	Seqüència	Referència
ITS	ITS5	Forward	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	(White et al. 1990)
	ITS4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>tub2</i>	Bt2a	Forward	GGTAACCAATCGGTGCTGCTTTC	(Glass et al. 1995)
	Bt2b	Reverse	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
<i>rpb2</i>	RPB2-5F	Forward	GA(T/C)GA(T/C)(A/C)G(A/T)GATCA(T/C)TT(T/C)GG	(Liu et al. 1999)
	RPB2-7Rc	Reverse	CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TTRCCCAT	

**Taula 2.** Concentració i volum dels components de la *master mix* per a l'amplificació per PCR.

Component	Concentració final	Volum per una reacció
EmeraldAmp GT ®	1X	12,5 μl
dH <sub>2</sub> O	-	9,5 μl
<i>Primer Forward</i>	0,2 μM	0,5 μl
<i>Primer Reverse</i>	0,2 μM	0,5 μl
ADN motlle (30 ng/μl)	< 10 ng/μl	2 μl
		<b>Volum final: 25 μl</b>

**Taula 3.** Condicions i cicles d'amplificació en la PCR dels diferents marcadors moleculars.

Locus	Desnaturalització inicial	Nº de cicles	Desnaturalització	Hibridació	Elongació	Elongació final
ITS y <i>tub2</i>	94 °C, 5'	35	94 °C, 30"	56 °C, 45"	72 °C, 1'	72°C, 7'
<i>rpb2</i>	94 °C, 5'	35	95 °C, 45"	56 °C, 1'	72 °C, 1'45"	72°C, 7'

Es va realitzar electroforesis en gel d'agarosa a l'1% per a comprovar la puresa dels amplicons. Els gels es van preparar manualment (1 g d'agarosa en 100 mL de TAE 1x (Tris/Acetat/EDTA) i 3 µl de RedSafe (iNtRON Biotechnology Inc., Korea)). Es van sotmetre a 90 V durant 45 min i es van revelar en transil·luminador. Les imatges es van obtenir amb el software ImageLab (Bio-Rad, California, USA). Les mostres que van donar lloc a una única banda corresponen a mostres amplificades correctament (veure **Material suplementari, Fig. 2s**).

### 10. Seqüenciació i identificació molecular

Per a la seqüenciació, es va tornar a quantificar l'ADN del tub d'amplificació, es va diluir a una concentració de 20 ng/µl per cada 100 parells de bases de la longitud de la seqüència amplificada teòrica i es va enviar a seqüenciar, amb els mateixos *primers* utilitzats a l'amplificació, a l'empresa MacroGen (Madrid, Espanya). Les seqüències es van analitzar amb el programa BioEdit 7.2 (BioEdit LTD, Manchester, Regne Unit) per seleccionar la part de la seqüència fiable i de qualitat.

La identificació presumptiva es va dur a terme per comparació de les seqüències amb les seqüències dipositades a la base de dades GenBank de l'NCBI mitjançant l'eina BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Aquelles seqüències que van donar resultats amb un percentatge de similitud major al 98% es van considerar identificades en quant a gènere i espècie, mentre que aquelles amb un percentatge menor al 98% requereixen estudi filogenètic detallat per establir si es tracta d'espècies noves.

### 11. Avaluació de la capacitat antagonista

Dues soques de *Trichoderma* (*T. atroviride*, T1 FMR 19309 i *T. harzianum* T7 FMR 19312) i dues d'*Epicoccum* (*Epicoccum cf nigrum* i *Epicoccum nigrum*) es van assajar enfront dos fongs fitopatògens, *Diplodia seriata* (FMR 18743) i *Didymella glomerata* (FMR 18750), agents causals de malalties de la fusta en vinya. Les soques fitopatògenes s'han obtingut de la col·lecció FMR de la Facultat de Medicina de la URV i han estat cedides pel Dr. Stchigel.

L'assaig de la capacitat antagonista es va dur a terme mitjançant dos mètodes diferents de cultiu dual. El mètode del cultiu dual clàssic avalua la capacitat d'inhibir el creixement dels fitopatògens per contacte directe i/o la producció de substàncies no volàtils, mentre que el mateix mètode realitzat sobre medi de cultiu separat en dos compartiments avalua la capacitat d'inhibició de l'antagonista per producció de substàncies volàtils, ja que les colònies no entren en contacte. En ambdós mètodes es va seguir una modificació del procediment descrit per Stracquadiano et al. (2020): es van col·locar en extrems oposats d'una placa d'agar PDA sense cloramfenicol, un disc de 5 mm d'un cultiu de 7 dies en agar PDA del patogen i de l'antagonista. En el cas del segon mètode, la placa d'agar PDA va ser prèviament dividida en dues meitats, eliminant en condicions estèrils, una línia central del medi d'1 cm d'espessor amb un bisturí. 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 amb l'objectiu de fer l'anàlisi estadístic.

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

$$PICR\% = \frac{(Dc - Dt)}{Dc} \cdot 100$$

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

## 12. Estudi metagenòmic

Dues mostres de rizosfera de vinyes en cultiu biodinàmic (**Taula 4**) es van enviar a l'empresa BiomeMakers SL (Spain) per fer-ne l'anàlisi del microbioma i obtenir informació sobre la qualitat del sòl, el seu estat de salut i resistència, la presència de patògens i la presència de potencials biocontroladors i fer-ne un anàlisi comparatiu.

**Taula 4.** Mostres i condicions seleccionades per a l'estudi metagenòmic del sòl.

Codi	Procedència	Condicions del cultiu
CFB003	Rizosfera cultiu de la varietat Garnatxa, finca "Carretera"	2 anys en cultiu biodinàmic
CFB004	Rizosfera cultiu de la varietat Carinyena, finca "Bienvenido"	Més de 10 anys de cultiu biodinàmic

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

---

### 1. Aïllament i identificació

Un total de 33 soques de *Trichoderma* s'han aïllat de totes les mostres recollides, d'entre les quals 23 soques de *Trichoderma* han estat identificades molecularment mitjançant el marcador *rpb2*, i 10 soques encara no han estat identificades a nivell molecular (**Material suplementari, Taula 1s**). D'entre elles, 18 soques de *Trichoderma* s'han aïllat de diferents mostres de rizosfera de cultius de vinya i de compostos manufacturats per l'empresa Clos Mogador SL.

D'entre totes les soques obtingudes, s'han identificat 9 espècies diferents de *Trichoderma*: *Trichoderma afroharzianum*, *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. guizhouense*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. saturnisporum* i *T. virens*.

Corresponents a les 18 soques de Clos Mogador SL, s'han identificat a nivell d'espècie un total de 5 soques de *Trichoderma harzianum*, 3 de *T. gamsii*, i una única soca de les espècies *T. afroharzianum*, *T. atroviride*, *T. ghizouense*, *T. koningiopsis* i *T. virens*. Tres soques, dues que presumptivament corresponen a *T. saturnisporum* (T4 FMR 19309 i T6 FMR 19311), i una a *T. harzianum* (T17 FMR 19549), requereixen un anàlisi filogenètic més detallat degut a que el percentatge d'identitat obtingut amb l'eina BLAST és menor al 98% i es podria tractar d'espècies noves. Finalment, tres de les soques obtingudes encara no s'han pogut identificar molecularment.

*Trichoderma afroharzianum*, *T. atroviride*, *T. virens* i dues soques de *T. harzianum* (T7 FMR 19312 i T10 FMR 19315) s'han aïllat de diferents mostres de compost manufacturats per la mateixa empresa Clos Mogador SL. *T. harzianum* T17 FMR 19549 s'ha aïllat d'un fermentat d'ortiga preparat també per l'empresa, mentre que la resta de soques, *T. ghizhouense*, *T. koningiopsis*, *T. saturnisporum*, *T. gamsii* i 2 soques de *T. harzianum* (T11 FMR 19316 i T33 FMR 19886) han estat aïllades de mostres de rizosfera dels camps de cultiu de vinya, tant de la rizosfera dels ceps com de la rizosfera de les cobertes vegetals.

L'espècie més representada és *T. harzianum*, amb 5 aïllats, i s'ha aïllat tant en mostres de compost com de rizosfera. Aquesta espècie s'ha aïllat en totes les condicions excepte l'activació amb fenol a 15 °C en medi DRBC. *T. gamsii* s'ha aïllat únicament a 25°C, tant en medi PCA com DRBC. Les espècies *T. atroviride*, *T. ghizouense* i *T. koningiopsis*

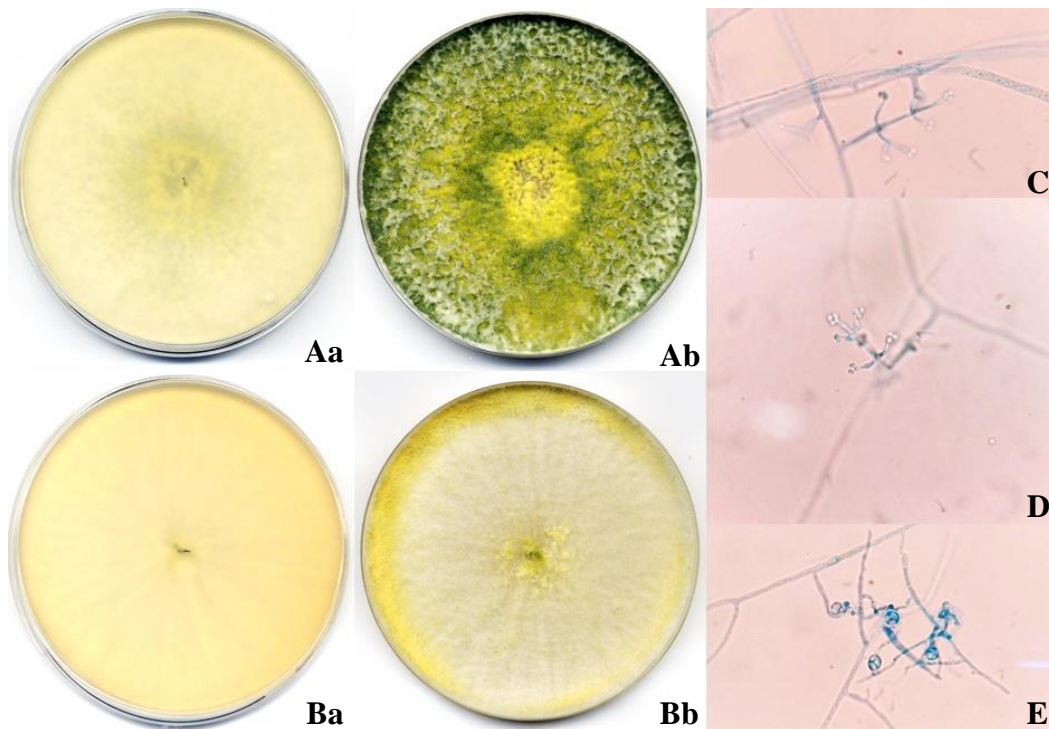
únicament s'han aïllat en agar PCA a 25 °C, mentre que *T. virens* s'ha aïllat en DRBC a 25 °C i *T. afroharzianum* en DRBC a 25 °C després de l'activació de la mostra amb fenol.

Les espècies de *Trichoderma* són comunes en la rizosfera dels camps de cultiu vitícoles, incloent *T. harzianum*, tal com van reportar González et al. (2011). És comú aïllar-les de la rizosfera ja que són atretes per la presència dels exsudats de les arrels, i aquestes soques són especialment interessants com a agents de biocontrol degut a que tenen una gran persistència i capacitat de colonització a les arrels (López-Bucio et al. 2015). A més, *Trichoderma* també pot actuar com a endòfit (Rajani et al. 2021).

Del gènere *Epicoccum* s'han aïllat un total de 3 soques a partir de teixit vegetal procedent de vinya. Les soques EPF (FMR 19857) i EPN (FMR 19959) s'han aïllat directament de fulles de vinya en cambra humida, mentre que la soca EPI (FMR 19856) s'ha aïllat de branques petites de cep sembrades en medi SNA. L'amplificació del marcador molecular *tub2* ha permès identificar a nivell d'espècie dues de les soques com a *Epicoccum nigrum* (EPF FMR 19857 i EPN FMR 19959). La soca EPI FMR 19856 morfològicament es correspon amb *E. nigrum* (**1.1. Identificació fenotípica, Fig. 9**), no obstant, encara no s'ha identificat molecularment. *E. nigrum* és reconegut com a endòfit de la vinya i com a agent biocontrolador (Del Frari et al. 2019; Taguiam et al. 2021; Koledenkova et al. 2022).

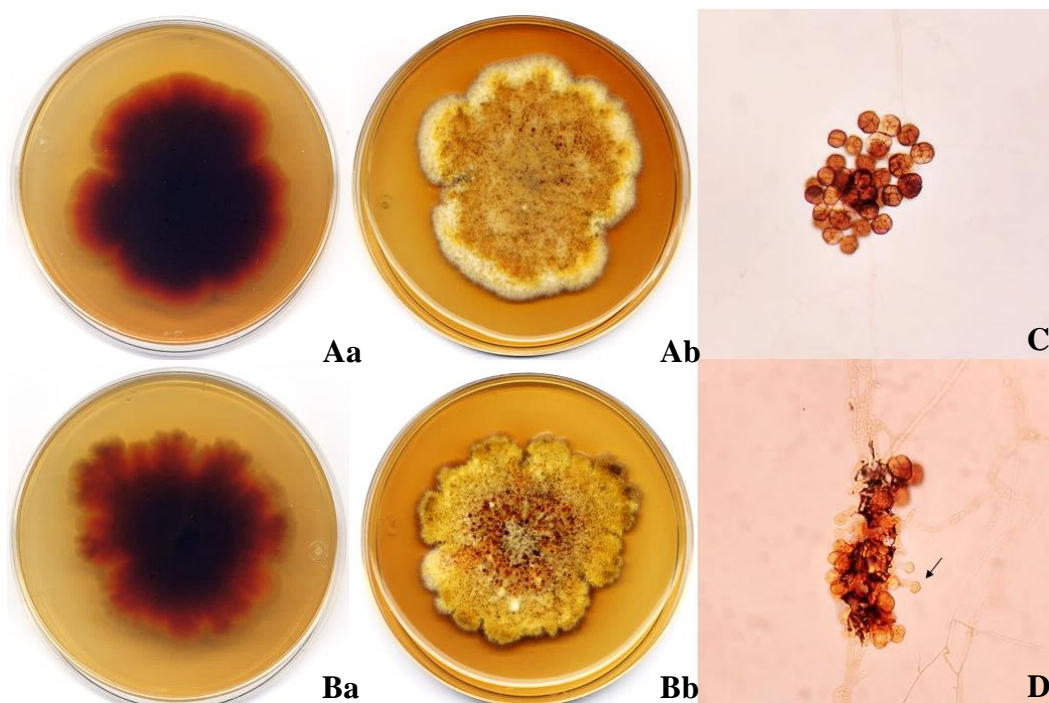
### 1.1. Identificació fenotípica

La identificació fenotípica es va dur a terme observant el creixement de les soques de *Trichoderma* i *Epicoccum* en plaques d'agar PDA als 7 i 14 dies d'incubació a 25 °C, respectivament (**Fig. 7 i 8 A i B**). Les imatges microscòpiques es van obtenir a partir de microcultius en agar PDA (**Fig. 7 i Fig. 8 C i D**). Es va confirmar que la morfologia es correspon amb les soques identificades molecularment.



**Figura 7.** Característiques morfològiques de les soques de *Trichoderma* seleccionades per als assajos *in vitro*. Cultiu en agar PDA, 7 dies d'incubació a 25 °C. **A.** *Trichoderma atroviride*, FMR 19306. **B.** *Trichoderma harzianum* FMR 19312. **a.** Revers de la placa. **b.** Anvers de la placa. **C i D.** Fiàlides amb conidis a l'extrem. **E.** Clamidòspores. **C, D i E:** *T. harzianum*, muntatge en blau de lactofenol, 100x.

28



**Figura 8.** Característiques morfològiques de les soques d'*Epicoccum* seleccionades per als assajos *in vitro*. Cultiu en agar PDA, 14 dies d'incubació a 25 °C. **A.** *Epicoccum nigrum* FMR 19857 **B.** *Epicoccum* sp. FMR 19857. **a.** Revers de la placa. **b.** Anvers de la placa. **C.** Conidis. **D.** Cèl·lula conidiògena (marcada amb una fletxa). **C i D:** *Epicoccum* sp., muntatge sobre solució Shears, 40x.

## 2. Recompte en placa

Es va fer el recompte d'unitats formadores de colònies (UFC) per gram de sòl de les plaques amb dilució  $10^{-3}$  en medi PCA i DRBC de les mostres CFB003 i CFB004 (**Taula 6**). La mostra CFB003 presenta menor població fúngica que la mostra CFB004.

**Taula 6.** Resultats del recompte d'UFC/g de terra de les mostres de Clos Mogador SL seleccionades.

Codi Mostra	Recompte (Dil. $10^{-3}$ )				UFC/g	
	PCA 25 °C		DRBC 25 °C		PCA 25 °C	DRBC 25 °C
CFB003	7	9	7	11	$8 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^5$
CFB004	30	10	50	65	$2 \cdot 10^6$	$5,75 \cdot 10^6$

Ambdues mostres pertanyen a la rizosfera de camps de vinya cultivats sota maneig biodinàmic. La mostra CFB003 prové d'un cultiu de la varietat Garnatxa de recent adquisició per part de l'empresa Clos Mogador SL (DO Priorat), que prèviament es trobava sota maneig convencional i només porta 2 anys amb pràctiques biodinàmiques, mentre que la mostra CFB004 prové d'un camp de Carinyena sotmès al maneig biodinàmic durant més de 10 anys per part de la mateixa empresa. No es poden extreure conclusions comparant únicament dues mostres individuals de cada condició i varietat, però els resultats obtinguts apunten a que el maneig biodinàmic afavoreix la població de la microbiota fúngica, ja que la mostra del cultiu que s'ha sotmès durant més temps a aquesta metodologia de cultiu, mostra un gran increment de població fúngica en el recompte. No obstant, cal tenir en compte que les varietats cultivades en cada camp són diferents. Tant el tipus de varietat cultivada com el tipus de pràctiques en el maneig del cultiu, són factors que modifiquen la població microbiana del sòl (Ortiz-Álvarez et al. 2021; Trivedi et al. 2020). Per tant, no podem determinar quin paper hi juga la pròpia planta en la interacció amb la microbiota, i fins a quin punt pot modificar la varietat del cultiu a la densitat i biodiversitat d'aquesta.

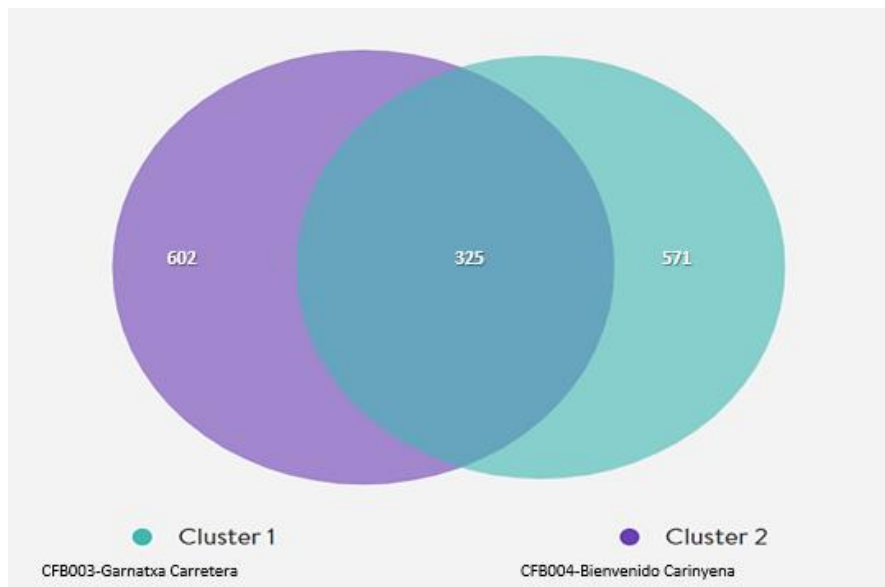
## 3. Anàlisi metagenòmic

Les mateixes mostres del recompte de colònies van ser enviades a l'empresa BiomeMakers per a l'anàlisi metagenòmic. Els informes resultants corresponen als **annexos 1 i 2** d'aquest manuscrit. Els resultats dels informes mostren un recompte total de  $10^7$  d'unitats fúngiques per gram de terra. El nombre d'individus de la població fúngica determinat per l'anàlisi metagenòmic és molt més alt que el nombre d'UFC per gram

obtingut en cultiu, ja que no tots els fongs són cultivables per mètodes tradicionals o es troben en condicions de competència desfavorables en condicions *in vitro*.

En relació amb la biodiversitat, els resultats BeCrop<sup>®</sup> determinen que la biodiversitat és baixa a la mostra CFB004 i mitja a la mostra CFB003. Els resultats en placa indiquen una població fúngica molt major a CFB004, pel que aparentment la biodiversitat s'esperaria més alta en aquesta mostra. No obstant, el recompte no determina en cap cas els gèneres presents i no pot concloure dades de biodiversitat. Comparativament, es detecten 602 espècies microbianes diferents a la CFB004 i 571 a la CFB003, i només 325 espècies coincideixen en ambdues mostres (**Fig. 9**). Aquests resultats ens indiquen la possible influència que té la varietat a l'hora de seleccionar els microorganismes que conformen la rizosfera, a més de permetre deduir que hi ha una comunitat relativament comuna que conforma un nucli constant en els cultius de *Vitis vinifera* tal com han descrit prèviament altres autors (Gobbi et al. 2022; Trivedi et al. 2020).

La pàgina web (<https://portal.becrop.com/>) permet analitzar els resultats en profunditat per part de l'usuari, a més de fer comparatives entre mostres. A la mostra CFB003 es va detectar la presència de *Trichoderma asperellum*, *Epicoccum nigrum*, *E. plurivorum* i *E. thailandicum*. Pel que fa a CFB004, es van detectar *Trichoderma aeruginosum*, *T. atroviride*, *T. piluliferum*, *Epicoccum keratinophilum* i *E. thailandicum*.



**Figura 9.** Diagrama de Venn. Comparació de la diversitat d'espècies presents en les mostres CFB003 i CFB004.

S'ha demostrat que els anàlisis metagenòmics detecten la presència d'espècies que no han estat aïllades en el mètode de cultiu en placa tradicional. *Trichoderma atroviride* ha estat

aïllada de les mostres i també s'ha detectat en l'anàlisi, no obstant, cap altra *Trichoderma* de les que s'han aïllat en placa ha estat reportada als informes. Els anàlisis BeCrop® es basen en les regions ITS de l'ARN ribosòmic dels microorganismes del sòl, mentre que les identificacions moleculars que nosaltres hem dut a terme es basen en marcadors d'ADN (la regió *rpb2* en el cas de les soques de *Trichoderma* i la regió *tub2* per a les soques d'*Epicoccum*). Encara que, *a priori*, ambdues tècniques són igual de vàlides a l'hora de fer identificacions, el marcador molecular de la plataforma és poc resolutiu per distingir espècies properes, de forma que no es detecta el conjunt d'aquelles que s'han trobat en cultiu.

Pel que fa a la qualitat i la salut del sòl, els informes determinen que la mostra CFB003 té una qualitat de terra mitjana, però de molt alta resistència. En canvi, per la CFB004, la qualitat és alta i la resistència alta. La resistència és calculada en relació amb les propietats de la comunitat microbiana i, especialment, la co-ocurrència o exclusió de parells de microorganismes, i reflecteix la resiliència que la xarxa microbiana pot oferir a les pertorbacions externes, tals com l'aplicació de pesticides. Aquesta informació està correlacionada amb el tipus de maneig del cultiu: els cultius sota maneig convencional mostren una resistència mitja o baixa, mentre que els biodinàmics mostren una resistència alta o molt alta (Ortiz-Álvarez et al. 2021). Ambdues mostres tenen una resistència alta o molt alta, de forma que es confirma que ambdues estan sota maneig biodinàmic i que aquesta pràctica millora la resistència de la xarxa microbiana del sòl.

L'estat de salut del terra i la capacitat de biocontrol és mitja en ambdues mostres analitzades. Es detecta risc lleu de *Botrytis*, malaltia de Petri, putrefacció per *Aspergillus* i *Cladosporium* en tots dos casos, mentre que en CFB004 també es detecta risc molt baix de la malaltia "peu negre", coneguda com a *Black foot*. El nivell de risc reportat es basa en l'abundància en la mostra dels patògens que causen la malaltia, a més de les relacions ecològiques del patògen amb altres microorganismes, de forma que es fa una estimació de la probabilitat de que les plantes pateixin infeccions, tenint en compte el tipus de cultiu. En el cas de CFB004, es detecten agents de biocontrol insecticides, bactericides i nematocides a nivell alt, i fungicides a nivell mig, mentre que en el cas del CFB003 els agents fungicides, insecticides i nematocides es troben a nivell mig, i els agents bactericides a nivell baix. Per tant, tot i que en ambdues mostres es detecta risc de malaltia i la presència de patògens, els riscos són lleus i en ambdues hi ha agents de biocontrol presents en el sòl. Cal destacar, però, que en el cas de la mostra CFB004, es detecten més

agents de biocontrol presents, ja que els nivells de bactericides, insecticides, nematicides i fungicides són més alts que en el cas de la mostra CFB003. Aquests són resultats que cabria esperar, ja que la mostra CFB004, sota maneig biodinàmic durant més temps que la mostra CFB003, té més població fúngica i més capacitat de resistència.

#### 4. Estudi de l'activitat antagonista

Les dues soques de *Trichoderma* assajades, *T. atroviride* i *T. harzianum*, han mostrat capacitat d'inhibició enfront les dues soques fitopatògenes *Diplodia seriata* i *Didymella glomerata*, amb un 100% d'inhibició als 14 dies pel mètode del cultiu dual, que permet avaluar si hi ha inhibició per contacte o per secreció de metabòlits no volàtils (**Taula 5**). Tal com s'aprecia a la **Fig. 11**, als 14 dies ambdues espècies de *Trichoderma* van envair tot l'espai del cultiu i creixen per sobre de les colònies dels fongs fitopatògens, degradant-ne el miceli. La inhibició sobre *D. seriata* i *D. glomerata* es duu a terme per mecanismes directes, ja que les colònies entren en contacte en el cultiu dual. El gènere *Trichoderma* es caracteritza especialment per la seva capacitat micoparasítica, un procés complex mitjançant el qual *Trichoderma* detecta fongs hostes (molts dels quals són fitopatògens) i secreta enzims que degraden la paret cel·lular del mateix, entre els quals trobem glucanases, quitinases i proteases (Silva et al. 2019). *Trichoderma atroviride* i *T. harzianum* posseeixen un sistema quitinolític complex, amb més de 6 enzims quitinolítics, endoquitinases i dues N-acetylhexoaminidases que els hi aporten gran capacitat micoparasítica (Ulhoa et al. 1991), pel que la inhibició observada i la capacitat de degradació sobre la colònia de *D. seriata* i *D. glomerata* es pot deduir que es deu a l'acció de micoparasitisme sobre les soques assajades. Per a confirmar l'acció micoparasítica, s'hauria d'observar la interacció de les hifes d'ambdós fongs mitjançant microscòpia electrònica, per confirmar la presència d'hifes de *Trichoderma* envoltant i perforant les hifes del patogen, tal com demostren Rajani et al. (2021) a l'enfrontar *T. harzianum* contra *Sclerotinia sclerotiorum* i *Sclerotium rolfsii*.

A més del micoparasitisme, les espècies de *Trichoderma* també han estat estudiades per la seva capacitat de producció de metabòlits secundaris, com pirones, terpens i gliotoxines, entre d'altres. Una de les pirones més produïdes per *Trichoderma* spp. és la 6-pentil-alfa-pirona (6PAP), la qual produeixen tant *T. harzianum* com *T. atroviride*, i que té una forta activitat antifúngica. Aquest metabòlit és biodegradable i mínimament

tòxic, el que el converteix en un molt bon candidat per al desenvolupament de fungicides agrícoles (Dale et al. 2017).

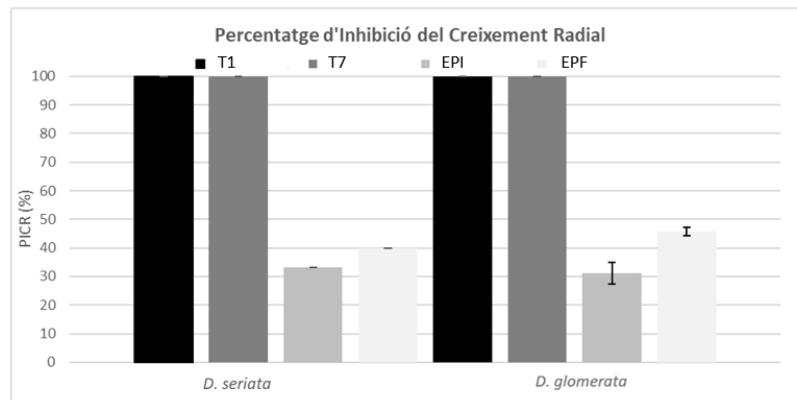
**Taula 5.** Percentatge d'inhibició del creixement radial (PICR) en assaig de cultiu dual de les soques de *Trichoderma* i *Epicoccum*. Els resultats s'expressen com  $\pm$  d'error estàndard després de 5, 7 i 14 dies d'incubació. ND: No determinat.

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

Per una 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 (**Fig. 10**). La soca d'*Epicoccum cf nigrum* FMR 19856 (EPI) exerceix la seva activitat inhibidora sense entrar en contacte amb el miceli del patogen, tal com es demostra en **la Fig.12 Aa**, on es pot observar que crea un halo d'inhibició d'1 cm al voltant de la zona de creixement de *D. seriata*. En canvi, la soca *E. nigrum* FMR 19857 no crea un halo d'inhibició enfront *D. seriata* (**Fig. 12 Ab**). Pel que fa a *Didymella glomerata*, ambdues soques d'*Epicoccum* assajades presenten capacitat antagonista. EPI FMR 19856 inhibeix el creixement de *D. glomerata* un 40% als 14 dies d'incubació, mentre que la soca EPF FMR 19857 és capaç d'inhibir el creixement un 45,78% (**Taula 5, Fig. 10**). En ambdós casos es pot observar la formació d'un halo d'inhibició de 0,7 cm (**Fig. 12 B**). Per tant, es pot deduir que el principal mecanisme que utilitza *E. nigrum* és l'antibiosi, i que la inhibició del creixement del miceli dels patògens es deu a la secreció de metabòlits secundaris amb acció fungistàtica. *Epicoccum nigrum* ha estat reportat prèviament com a un bon candidat a agent de biocontrol, i la seva activitat antagonista s'atribueix a la producció de metabòlits

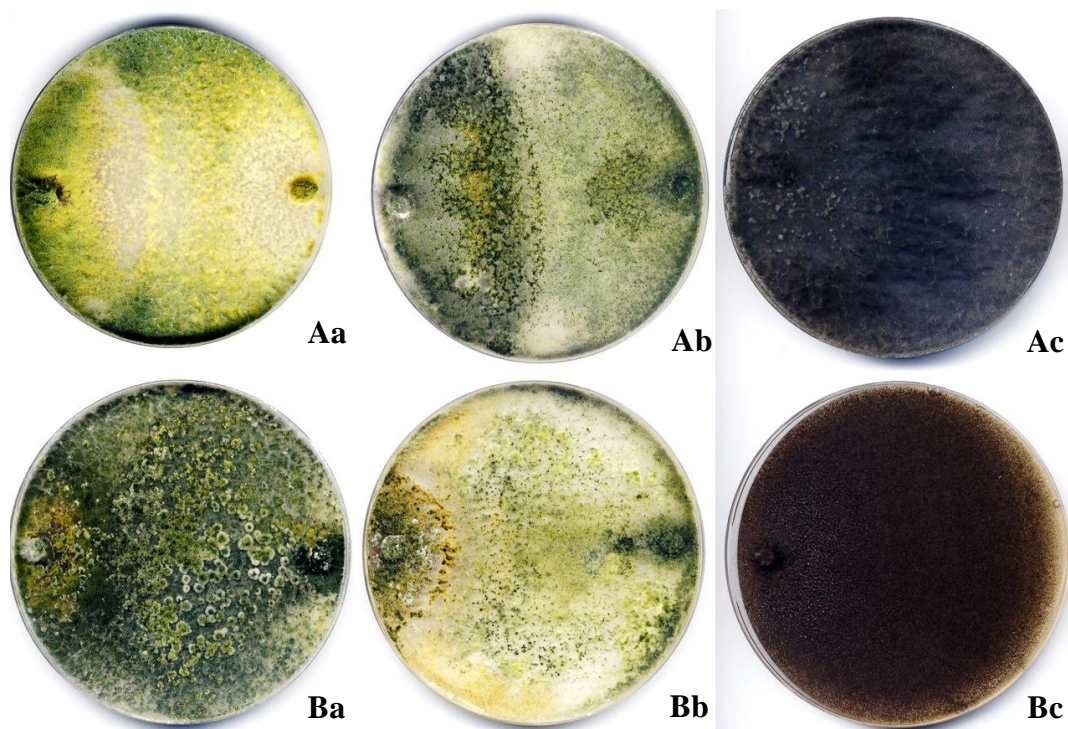
secundaris com l'epipirona A (Lee et al. 2020) i la epicorazina A (Harwoko et al. 2021), entre d'altres, amb activitat antifúngica.

Tant *Trichoderma* sp. com *Epicoccum nigrum* havien demostrat prèviament capacitat biocontroladora contra fongs causants de malalties de la fusta en vinya, com *Diaporthe* sp., *Phialophora fastigiata*, *Diplodia pseudoseriata* (de Almeida et al. 2020), *Diplodia seriata* o *Neofusicoccum parvum* (Silva-Valderrama et al. 2021).

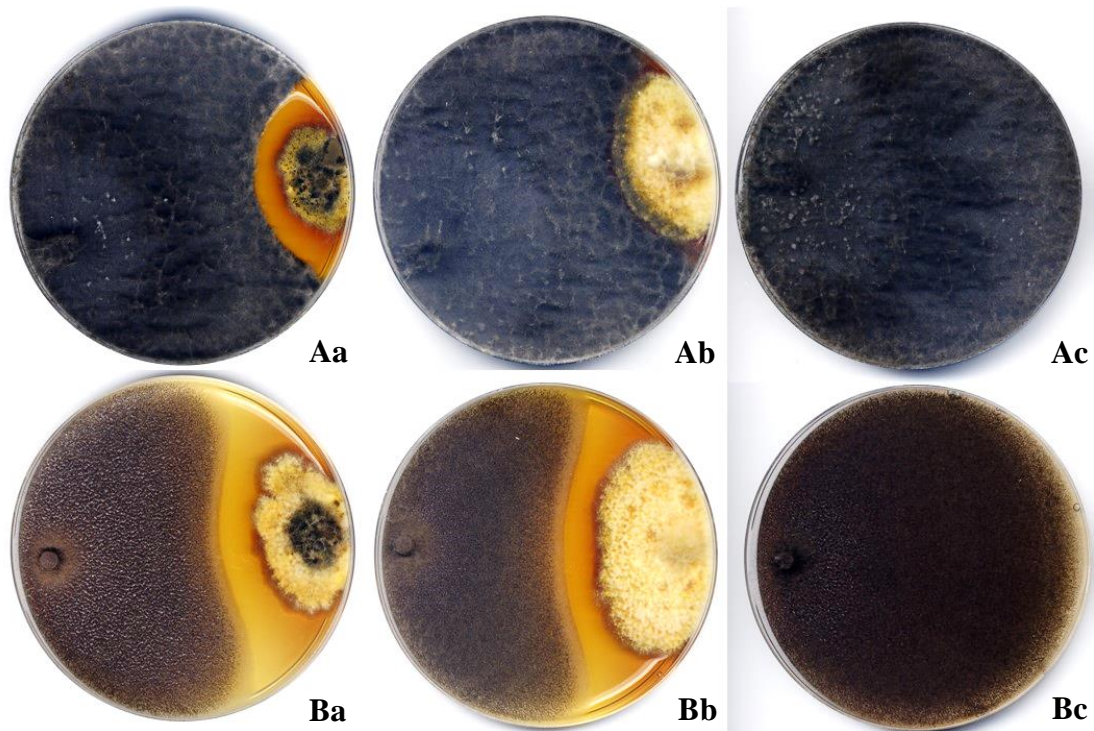


**Figura 10.** Percentatge d'inhibició del creixement radial de *Trichoderma* i *Epicoccum* enfront *D. seriata* i *D. glomerata*. Les barres d'error corresponen a l'error estàndard calculat.

34



**Figura 11.** Cultiu dual de les soques de *Trichoderma* als 14 dies d'incubació. *Diplodia seriata* (A) i *Didymella glomerata* (B) en co-cultiu (a l'esquerra de cada placa) amb *Trichoderma atroviride* FMR 19306 (a), *Trichoderma harzianum* FMR 19312 (b) i el control (c).



**Figura 12.** Cultiu dual de les soques d'*Epicoccum* als 14 dies d'incubació. *Diplodia seriata* (A) i *Didymella glomerata* (B) en co-cultiu (a l'esquerra de cada placa) amb *Epicoccum* sp. FMR 19856 (a), *Epicoccum nigrum* FMR 19857 (b) i el control (c).

35

Pel que fa al segon mètode de cultiu dual que s'ha dut a terme, en el qual l'agar s'ha dividit en dues zones diferenciades per evitar la interacció directa dels micelis dels fongs i avaluar si hi ha inhibició per metabòlits volàtils, no es va detectar inhibició per part de cap de les dues soques de *Trichoderma* assajades enfront *Diplodia seriata*. Això permet deduir que la inhibició que causa tant *T. harzianum* com *T. atroviride* no és deguda a la presència de metabòlits volàtils, sinó que es deu a la inhibició directa per part de metabòlits no volàtils i/o al micoparasitisme. En el cas de *D. glomerata* no es va poder interpretar l'experiment, ja que ambdues soques de *Trichoderma* van envair l'espai contrari de la placa, i les colònies dels dos fongs van entrar en contacte directe. Aquest mètode tampoc es va poder interpretar en els cultius duals d'*Epicoccum* enfront *D. seriata*, ja que el fitopatògen també va envair l'agar contrari. No obstant, es va poder determinar que cap de les dues soques d'*Epicoccum* estudiades inhibeixen el creixement de *D. glomerata* quan no hi ha contacte entre les colònies. Per tant, es pot deduir que la inhibició que les soques de *Epicoccum* cf *nigrum* i *E. nigrum* exerceixen contra *D. glomerata* no està causada per acció de metabòlits volàtils (dades no mostrades, les figures es mostren a [Material suplementari](#), **Fig. 3s** i **Fig. 4s**).

S'ha de destacar que el segon mètode utilitzat de cultiu dual no és útil per a determinar la inhibició per metabòlits volàtils quan es treballa amb soques de creixement expansiu. Dividir l'agar en dues parts diferenciades sense una barrera física, ha demostrat no tenir la capacitat de detenir el creixement dels fongs en la zona de la placa lliure de medi de cultiu. Per tant, per dur a terme aquesta part de l'experimentació s'haurien d'utilitzar plaques de Petri comercials dividides en seccions.

Els resultats en conjunt demostren la hipòtesi i confirmen que existeixen microorganismes antagonistes a la microbiota autòctona dels cultius de vinya, els quals contribueixen a la resiliència de les plantes a les malalties.

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 estudiades del tot (He et al. 2021; Del Frari et al. 2019), pel que els fongs antagonistes han de ser estrictament avaluats per entendre les implicacions ecològiques, biològiques i evolutives. En aquest cas, al tractar-se de microbiota autòctona, els microorganismes es troben ja adaptats a la comunitat microbiana (Perazzolli et al. 2014), de forma que el paper que juguen en l'ecosistema està ben definit -sigui o no conegut- i, *a priori*, el risc de causar desequilibris que impliquin conseqüències negatives per a la planta o el microbioma estaria minimitzat. Igualment, tenint en compte que algunes espècies d'*Epicoccum* han estat descrites com a fitopatògenes en altres espècies vegetals, una consideració prèvia al desenvolupament d'accions encaminades a la comercialització d'un bioproducte, seria assegurar que les soques amb que es treballa no causen malalties a les plantes, mitjançant assajos *in vivo* previs als assajos de camp, tal com recomanen Del Frari et al. (2019).

Finalment, és important entendre que les malalties criptogàmiques, així com la resta de malalties de les plantes, sovint resulten d'un desequilibri en l'ecosistema. L'èxit del control biològic recau sobre un ecosistema sa, que contingui una xarxa microbiana rica en espècies competidores i bioestimulants. La interacció del microbioma amb la planta i altres organismes del sòl és crucial per al manteniment de l'ecosistema funcional i per a la defensa natural de les plantes contra els fitopatògens (He et al. 2021). En aquest sentit, és important estudiar els agents de biocontrol no només com a antagonistes, sinó també com a bioestimulants del creixement o de la resistència vegetal induïda, a més de considerar les tècniques de maneig dels cultius, promovent la substitució dels fungicides

i pesticides químics per preparats naturals o agents de biocontrol, entre d'altres pràctiques que formen part de la viticultura orgànica o biodinàmica.

## PERSPECTIVES DE FUTUR

---

En primer lloc, aquest treball correspon a un estudi preliminar i és necessari identificar amb seguretat totes les soques aïllades, tal com es destaca a la Taula 1s ([Material suplementari](#)). A més, s'ha de realitzar l'estudi filogenètic d'aquelles soques amb percentatge d'identitat menor al 98% en els resultats del BLAST, per tal d'establir si són espècies noves.

També és necessari destacar que no només les soques seleccionades de *Trichoderma*, *T. atroviride* i *T. harzianum*, tenen potencial antagonista contra les malalties criptogàmiques, sinó que moltes de les espècies identificades en aquest estudi també tenen capacitat antifúngica, encara que no s'hagin provat *in vitro*, com és el cas de *T. gamsii*, *T. afroharzianum* o *T. viride* (Chen et al. 2016; Zhang et al. 2015; John et al. 2010). En aquest sentit, futurs estudis són necessaris per estudiar el seu potencial antagonista enfront els patògens seleccionats. En afegit, estudis enfront altres patògens causants de malalties criptogàmiques vitícoles s'han de dur a terme per comprovar l'activitat dels agents de control biològic en relació amb el màxim nombre d'agents causals possible, com poden ser *Botrytis cinerea*, *Phaeoacremonium minimum*, *Seimatosporium vitis* o *Plasmopara viticola*. A més, tenint en compte les diferents capacitats i característiques dels microorganismes biocontroladors i els diversos mecanismes que utilitzen per exercir els efectes antifúngics, és interessant contemplar la opció de combinar-los. De fet, l'aplicació de mesclades d'agents antagonistes ha demostrat millorar l'eficàcia biocontroladora (Thambugala et al. 2020), com n'és un exemple el producte Ketomium®, basat en 22 soques del gènere *Chaetomium* (Soytong et al. 2001) o BinabT®, basat en *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma polysporum* (Thambugala et al. 2020).

Igualment, els assajos *in vitro* de microorganismes antagonistes són només un pas previ, encara que necessari, per a l'establiment de solucions alternatives als fungicides químics. Un cop confirmada l'activitat biocontroladora o bioestimulant d'una soca fúngica *in vitro*, és necessari dur a terme assajos *in vivo* i *in situ* posteriors. Els assajos *in vivo* es duen a terme en ceps plantats en torretes, mentre que els assajos *in situ* es desenvolupen ja en camps de cultiu o en hivernacles, i és necessari que es superin satisfactòriament totes les

etapes dels estudis per a poder considerar un microorganisme com a un potencial agent biocontrolador, especialment a l'hora de desenvolupar un producte comercial basat en el microorganisme viu (Thambugala et al. 2020). *Epicoccum nigrum* ha estat assajat *in vivo* contra els fongs causants de malalties de la fusta en vinya *Phaeoacremonium mínimum* i *Phaeomoniella chlamydospora* i ha demostrat causar un considerable decreixement en la simptomatologia de les malalties, sense afectar negativament al creixement de les plantes (Del Frari et al. 2019).

Per una altra banda, el desenvolupament de la biotecnologia moderna i les tècniques d'enginyeria genètica i l'ADN recombinant i la genòmica poden potenciar les estratègies del control biològic en un futur molt proper (Thambugala et al. 2020; Adnan et al. 2019). No només els microorganismes vius o les espores poden ser utilitzades com a agents de biocontrol, sinó que els metabòlits bioactius poden ser recuperats en cultiu o sintetitzats mitjançant tècniques d'enginyeria genètica per desenvolupar productes més efectius i segurs, a més de naturals i ecològics.

No obstant, per al desenvolupament d'un producte comercial s'han de tenir en compte molts altres aspectes. En primer lloc, els productes basats en microorganismes vius són especialment sensibles a les condicions ambientals a l'hora de ser aplicats, pel que és imprescindible desenvolupar fórmules altament estables i capaces de sobreviure a les condicions dels cultius on previsiblement s'hagin d'utilitzar. A més, han de complir els criteris normatius per a la seva comercialització establerts pels organismes reguladors de la zona, amb especial èmfasi en que siguin microorganismes innocus per altres espècies vegetals, els animals i els humans. Per últim, han de passar múltiples etapes a l'hora de poder-los produir a escala industrial, tals com l'aïllament en cultiu pur, l'enriquiment, la caracterització, el desenvolupament d'una fórmula viable, la producció massiva, les condicions òptimes per a la conservació, i totes les etapes burocràtiques de registre i màrqueting, de forma que és un procés costós en quant a economia i temps (Thambugala et al. 2020).

## CONCLUSIONS

---

S'han aïllat 33 soques de *Trichoderma* i 3 soques d'*Epicoccum* amb potencial biocontrolador de mostres de sòl de vinyes DO Priorat. *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma atroviride* han mostrat la major capacitat antagonista amb un 100% d'inhibició enfront *Diplodia seriata* i *Didymella glomerata* i *Epicoccum nigrum* ha

mostrat eficàcia enfront *Didymella glomerata* amb més d'un 45% d'inhibició als 14 dies de cultiu.

L'anàlisi metagenòmic de dues mostres de rizosfera de vinya ha confirmat que el mètode de cultiu biodinàmic millora la resistència de la xarxa microbiana al sòl enfront les perturbacions externes i la capacitat de biocontrol dels patògens que afecten als ceps.

Es pot concloure que els fongs són una bona alternativa en estudi per al control de les malalties criptogàmiques en el marc del nou model agrícola a desenvolupar sota el paraigua del Pacte Verd Europeu, més sostenible i respectuós amb el medi ambient.

## AUTOAVALUACIÓ

---

El present Treball de Fi de Grau, així com tot el recorregut universitari, ha suposat un autèntic repte. Ha requerit esforç, treball dur, sobreposar-se al cansament i a les limitacions mentals. No obstant, he après que l'organització és fonamental i que l'autonomia és imprescindible, però que el treball en equip és la peça clau que completa el trencaclosques.

Les pràctiques a la Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental m'han fet créixer com a professional, aplicar i ampliar els conceptes adquirits durant els graus i completar la meva formació. Però també m'han fet créixer com a persona, com a companya i com a amiga. Les relacions laborals són tan importants com les relacions personals, i al grup de treball he reforçat l'empatia, el col·laboracionisme i el treball en equip.

Individualment, participar al Projecte d'organismes antagonistes m'ha brindat la oportunitat de treballar unint les dues meves passions: el camp i el laboratori. Ha estat una experiència exigent, on he hagut de sobreposar-me a les meves pors i alhora gratificant, que m'ha permès obrir els ulls i aprendre a mirar l'agricultura com un acte d'estima no només al camp, sinó als petits individus que el conformen. La Doctora Dania García, a més de tutoritzar-me el treball tant escrit com pràctic, m'ha fet partícip de tots els actes del projecte i m'ha brindat tantes oportunitats com s'han presentat (*gràcies de nou*). He participat en reunions amb els productors col·laboradors del projecte, jornades tècniques del Departament d'Acció Climàtica i Agenda Rural de la Generalitat de Catalunya, i els resultats del projecte els presentaré personalment en una comunicació oral en el pròxim Simposi de Botànica Criptogàmica de València al Juliol d'aquest any. Així que el repte encara no ha acabat.

He après moltíssim de micologia, tècniques d'aïllament tradicionals, biologia molecular i agricultura. Però també de valors, d'esforç, d'humanitat, de relacions, de divulgació i del món universitari. Guardaré ben a dins l'experiència i l'aprenentatge. L'aventura continua.

## BIBLIOGRAFIA

---

Adnan, Muhammad, Waqar Islam, Asad Shabbir, Khalid Ali Khan, Hamed A. Ghramh, Zhiquan Huang, Han Y.H. Chen, and Guo dong Lu. 2019. "Plant Defense against Fungal Pathogens by Antagonistic Fungi with Trichoderma in Focus." *Microbial Pathogenesis* 129 (December 2018): 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042>.

Almeida, Angela Billar de, Jonathan Concas, Maria Doroteia Campos, Patrick Materatski, Carla Varanda, Mariana Patanita, Sergio Murolo, Gianfranco Romanazzi, and Maria Do Rosário Félix. 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>.

Arya, Arun, and Analía Edith Perelló. 2010. *Management of Fungal Plant Pathogens*. *Management of Fungal Plant Pathogens*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01730.x>.

Bakker, Peter A.H.M., Roeland L. Berendsen, Johan A. Van Pelt, Gilles Vismans, Ke Yu, Erqin Li, Sietske Van Bentum, et al. 2020. "The Soil-Borne Identity and Microbiome-Assisted Agriculture: Looking Back to the Future." *Molecular Plant* 13 (10): 1394–1401. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.09.017>.

Ballen, Cissy J., and Harry W. Greene. 2017. "Walking and Talking the Tree of Life: Why and How to Teach about Biodiversity." *PLOS Biology* 15 (3): e2001630. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2001630>.

Bernardes, Mariana Furio Franco, Murilo Pazin, Lilian Cristina Pereira, and Daniel Junqueira Dorta. 2015. "Impact of Pesticides on Environmental and Human Health." In *Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment*. <https://doi.org/10.5772/59710>.

Chen, Jin Lian, Shi Zhong Sun, Cui Ping Miao, Kai Wu, You Wei Chen, Li Hua Xu, Hui

- Lin Guan, and Li Xing Zhao. 2016. “Endophytic *Trichoderma Gamsii* YIM PH30019: A Promising Biocontrol Agent with Hyperosmolar, Mycoparasitism, and Antagonistic Activities of Induced Volatile Organic Compounds on Root-Rot Pathogenic Fungi of *Panax Notoginseng*.” *Journal of Ginseng Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.09.006>.
- Chen, Q., L. W. Hou, W. J. Duan, P. W. Crous, and L. Cai. 2017. “Didymellaceae Revisited.” *Studies in Mycology* 87 (June): 105–59. <https://doi.org/10.1016/J.SIMYCO.2017.06.002>.
- Chen, Q., J. R. Jiang, G. Z. Zhang, L. Cai, and P. W. Crous. 2015. “Resolving the Phoma Enigma.” *Studies in Mycology* 82: 137–217. <https://doi.org/10.1016/J.SIMYCO.2015.10.003>.
- Cimmino, Alessio, Zeinab Bahmani, Marco Masi, Jafar Abdollahzadeh, Jahanshir Amini, Angela Tuzi, and Antonio Evidente. 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, Rebeca, Ana Ibañez, Alba Diez-Galán, Carla Calvo-Peña, Seyedehtannaz Ghoreshizadeh, and Juan José R. Coque. 2022. “The Grapevine Microbiome to the Rescue: Implications for the Biocontrol of Trunk Diseases.” *Plants* 11 (7): 840. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11070840>.
- Conway, Stephen. 2020. “A Short History of ....” *A Short History of the American Revolutionary War*, 1–17. <https://doi.org/10.5040/9780755603817.0010>.
- Daley, D. K., K. J. Brown, and S. Badal. 2017. *Fungal Metabolites. Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00020-2>.
- Díaz, Gonzalo A, Jaime Auger, Ximena Besoain, Edmundo Bordeu, and Bernardo A Latorre. 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>.
- Duke, Stephen O. 2018. “Interaction of Chemical Pesticides and Their Formulation Ingredients with Microbes Associated with Plants and Plant Pests.” Review-article.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (29): 7553–61.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02316>.
- “EUR-Lex - 32007R0834 - EN - EUR-Lex.” n.d. Accessed June 3, 2022. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32007R0834>.
- “EUR-Lex - 32021R1165 - EN - EUR-Lex.” n.d. Accessed June 3, 2022. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32021R1165>.
- “EUR-Lex - 52019DC0640 - EN - EUR-Lex.” n.d. Accessed June 2, 2022. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=COM:2019:640:FIN>.
- “EUR-Lex - 52020DC0381 - EN - EUR-Lex.” n.d. Accessed June 3, 2022. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=COM:2020:381:FIN>.
- Fajarningsih, Nurrahmi Dewi. 2016. “Internal Transcribed Spacer (ITS) as Dna Barcoding to Identify Fungal Species: A Review.” *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology* 11 (2): 37.  
<https://doi.org/10.15578/squalen.v11i2.213>.
- FávaroLé, Léia Cecilia Lima de, Fernando Lucas Melo de, Carlos Ivan Aguilar-Vildoso, and Welington Luiz Araújo. 2011. “Polyphasic Analysis of Intraspecific Diversity in *Epicoccum Nigrum* Warrants Reclassification into Separate Species.” *PLoS ONE*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014828>.
- Fisher, Matthew C., Daniel A. Henk, Cheryl J. Briggs, John S. Brownstein, Lawrence C. Madoff, Sarah L. McCraw, and Sarah J. Gurr. 2012. “Emerging Fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health.” *Nature* 484 (7393): 186–94.  
<https://doi.org/10.1038/nature10947>.
- Frari, Giovanni Del, Ana Cabral, Teresa Nascimento, Ricardo Boavida Ferreira, and Helena Oliveira. 2019. “*Epicoccum Layuense* a Potential Biological Control Agent of Esca-Associated Fungi in Grapevine.” *PLoS ONE*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213273>.
- García, María Caridad Cepero de, Silvia Restrepo Restrepo, Ana Esperanza Franco-Molano, Martha Cárdenas Toquica, and Natalia Vargas Estupiñán. 2012. *Biología de Hongos. Universidad de Los Andes*.  
[https://ediciones.uniandes.edu.co/Documents/Paginas\\_preliminares/Biología de](https://ediciones.uniandes.edu.co/Documents/Paginas_preliminares/Biología_de)

hongos.pdf.

- Gauthier, Gregory M., and Nancy P. Keller. 2013. "Crossover Fungal Pathogens: The Biology and Pathogenesis of Fungi Capable of Crossing Kingdoms to Infect Plants and Humans." *Fungal Genetics and Biology* 61: 146–57. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.08.016>.
- Ghoul, Melanie, and Sara Mitri. 2016. "The Ecology and Evolution of Microbial Competition." *Trends Microbiol* 24 (10): 833–45. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011>.
- Glass, N. L., and G. C. Donaldson. 1995. "Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes." *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>.
- Gobbi, Alex, Alberto Acedo, Nabeel Imam, Rui G. Santini, Rüdiger Ortiz-Álvarez, Lea Ellegaard-Jensen, Ignacio Belda, and Lars H. Hansen. 2022. "A Global Microbiome Survey of Vineyard Soils Highlights the Microbial Dimension of Viticultural Terroirs." *Communications Biology* 2022 5:1 5 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03202-5>.
- González, Vicente, and María Luisa Tello. 2011. "The Endophytic Mycota Associated with *Vitis Vinifera* in Central Spain." *Fungal Diversity*. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0073-x>.
- Gougoulias, Christos, Joanna M. Clark, and Liz J. Shaw. 2014. "The Role of Soil Microbes in the Global Carbon Cycle: Tracking the below-Ground Microbial Processing of Plant-Derived Carbon for Manipulating Carbon Dynamics in Agricultural Systems." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (12): 2362. <https://doi.org/10.1002/JSFA.6577>.
- Harwoko, Harwoko, Georgios Daletos, Fabian Stuhldreier, Jungho Lee, Sebastian Wesselborg, Michael Feldbrügge, Werner E.G. Müller, Rainer Kalscheuer, Elena Ancheeva, and Peter Proksch. 2021. "Dithiodiketopiperazine Derivatives from Endophytic Fungi *Trichoderma Harzianum* and *Epicoccum Nigrum*." *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1627348>.
- Hawksworth, David L., and Robert Lücking. 2017. "Fungal Diversity Revisited: 2.2 to

- 3.8 Million Species.” *Microbiology Spectrum* 5 (4).  
<https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0052-2016>.
- He, Dun Chun, Meng Han He, Divina M. Amalin, Wei Liu, Dionisio G. Alvindia, and Jiasui Zhan. 2021. “Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Economic Consideration.” *Pathogens* 10 (10).  
<https://doi.org/10.3390/pathogens10101311>.
- Hou, L. W., J. Z. Groenewald, L. H. Pfenning, O. Yarden, P. W. Crous, and L. Cai. 2020. “The Phoma-like Dilemma.” *Studies in Mycology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.001>.
- Jaklitsch, W. M., and H. Voglmayr. 2015. “Biodiversity of Trichoderma (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia.” *Studies in Mycology* 80: 1–87.  
<https://doi.org/10.1016/J.SIMYCO.2014.11.001>.
- Jayasiri, SC, KD Hyde, EBG Jones, R. Jeewon, HA Ariyawansa, JD Bhat, E. Camporesi, and JC Kang. 2017. “Taxonomy and Multigene Phylogenetic Evaluation of Novel Species in Boeremia and Epicoccum with New Records of Ascochyta and Didymella (Didymellaceae).” *Mycosphere* 8 (8): 1080–1101.  
<https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/8/9>.
- John, Rojan P., R. D. Tyagi, D. Prévost, Satinder K. Brar, Stéphan Pouleur, and R. Y. Surampalli. 2010. “Mycoparasitic Trichoderma Viride as a Biocontrol Agent against Fusarium Oxysporum f. Sp. Adzuki and Pythium Arrhenomanes and as a Growth Promoter of Soybean.” *Crop Protection*.  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.08.004>.
- Keiblinger, Katharina M., Martin Schneider, Markus Gorfer, Melanie Paumann, Evi Deltedesco, Harald Berger, Lisa Jöchlinger, et al. 2018. “Assessment of Cu Applications in Two Contrasting Soils—Effects on Soil Microbial Activity and the Fungal Community Structure.” *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1888-y>.
- Koledenkova, Kseniia, Qassim Esmaeel, Cédric Jacquard, Jerzy Nowak, Christophe Clément, and Essaid Ait Barka. 2022. “Plasmopara Viticola the Causal Agent of Downy Mildew of Grapevine: From Its Taxonomy to Disease Management.” *Frontiers in Microbiology* 13 (May). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.889472>.

- Komárek, Michael, Eva Čadková, Vladislav Chrastrný, François Bordas, and Jean Claude Bollinger. 2010. “Contamination of Vineyard Soils with Fungicides: A Review of Environmental and Toxicological Aspects.” *Environment International* 36 (1): 138–51. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2009.10.005>.
- Lee, Alex J., Melissa M. Cadelis, Sang H. Kim, Simon Swift, Brent R. Copp, and Silas G. Villas-Boas. 2020. “Epiapyrone A, a Broad-Spectrum Antifungal Compound Produced by *Epicoccum Nigrum* ICMP 19927.” *Molecules (Basel, Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/molecules25245997>.
- Li, Yuanning, Jacob L. Steenwyk, Ying Chang, Yan Wang, Timothy Y. James, Jason E. Stajich, Joseph W. Spatafora, et al. 2021. “A Genome-Scale Phylogeny of the Kingdom Fungi.” *Current Biology* 31 (8): 1653-1665.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2021.01.074/ATTACHMENT/9699D385-9811-4013-80C1-A3862B009117/MMC6.XLSX>.
- Liu, Yajuan J., Sally Whelen, and Benjamin D. Hall. 1999. “Phylogenetic Relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit.” *Molecular Biology and Evolution* 16 (12): 1799–1808. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A026092>.
- Lluís, Josep, Pérez Verdú, and Alvaro Feliu Jofre. n.d. “Priorat Manual de Técnicas Para Una Viticultura de Montaña Sostenible.”
- López-Bucio, José, Ramón Pelagio-Flores, and Alfredo Herrera-Estrella. 2015. “Trichoderma as Biostimulant: Exploiting the Multilevel Properties of a Plant Beneficial Fungus.” *Scientia Horticulturae* 196: 109–23. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>.
- M Kröber, D Wibberg, R Grosch, F Eikmeyer, B Verwaaijen, SP Chowdhury, A Hartmann, A Pühler, A Schlüter. 2014. “Effect of the Strain *Bacillus Amyloliquefaciens* FZB42 on the Microbial Community in the Rhizosphere of Lettuce under Field Conditions Analyzed by Whole Metagenome Sequencing.” *Front Microbiol* 5: 252.
- Maharachchikumbura, Sajeewa S.N., Kevin D. Hyde, E. B.Gareth Jones, E. H.C. McKenzie, Jayarama D. Bhat, Monika C. Dayarathne, Shi Ke Huang, et al. 2016. “Families of Sordariomycetes.” *Fungal Diversity* 2016 79:1 79 (1): 1–317.

<https://doi.org/10.1007/S13225-016-0369-6>.

Maioli, Francesco, Monica Picchi, Valentina Millarini, Paola Domizio, Gabriele Scozzafava, Bruno Zanoni, and Valentina Canuti. 2021. "A Methodological Approach to Assess the Effect of Organic, Biodynamic, and Conventional Production Processes on the Intrinsic and Perceived Quality of a Typical Wine: The Case Study of Chianti DOCG." <https://doi.org/10.3390/foods10081894>.

Mayerhofer, Johanna, Sonja Eckard, Martin Hartmann, Giselher Grabenweger, Franco Widmer, Adrian Leuchtman, and Jürg Enkerli. 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>.

McCarthy, Charley G. P., and David A. Fitzpatrick. 2017. "Phylogenomic Reconstruction of the Oomycete Phylogeny Derived from 37 Genomes." *MSphere* 2 (2). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00095-17>.

Mondello, Vincenzo, Aurélie Songy, Enrico Battiston, Catia Pinto, Cindy Coppin, Patricia Trotel-Aziz, Christophe Clément, Laura Mugnai, and Florence Fontaine. 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>.

"ORDRE ARP/154/2020, de 16 de Setembre, per La Qual s'aproven Les Bases Reguladores Dels Ajuts *de Minimis* Destinats a Compensar Les Pèrdues Econòmiques de Les Explotacions Vitícoles Durant La Campanya 2020-2021 Com a Conseqüència de l'afectació de La Plaga de Mildiu." n.d. Accessed June 2, 2022. <https://dogc.gencat.cat/ca/document-del-dogc/?documentId=882036>.

Ortiz-Álvarez, Rüdiger, Héctor Ortega-Arranz, Vicente J. Ontiveros, Miguel de Celis, Charles Ravarani, Alberto Acedo, and Ignacio Belda. 2021. "Network Properties of Local Fungal Communities Reveal the Anthropogenic Disturbance Consequences of Farming Practices in Vineyard Soils." *MSystems* 6 (3). <https://doi.org/10.1128/msystems.00344-21>.

Perazzolli, Michele, Livio Antonielli, Michelangelo Storari, Gerardo Puopolo, Michael Pancher, Oscar Giovannini, Massimo Pindo, and Ilaria Pertot. 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>.
- Rajani, P., C. Rajasekaran, M. M. Vasanthakumari, Shannon B. Olsson, G. Ravikanth, and R. Uma Shaanker. 2021. “Inhibition of Plant Pathogenic Fungi by Endophytic *Trichoderma* Spp. through Mycoparasitism and Volatile Organic Compounds.” *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126595>.
- Schoch, Conrad L., Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen, et al. 2012. “Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16): 6241–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Sil, Anita, and Alex Andrianopoulos. 2015. “Thermally Dimorphic Human Fungal Pathogens—Polyphyletic Pathogens with a Convergent Pathogenicity Trait.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (8): 1–17.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019794>.
- Silva-Valderrama, Isidora, Diana Toapanta, Maria de los Angeles Miccono, Mauricio Lolas, Gonzalo A. Díaz, Dario Cantu, and Alvaro Castro. 2021. “Biocontrol Potential of Grapevine Endophytic and Rhizospheric Fungi Against Trunk Pathogens.” *Frontiers in Microbiology* 11 (January): 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.614620>.
- Silva, Roberto N., Valdirene Neves Monteiro, Andrei Stecca Steindorff, Eriston Vieira Gomes, Eliane Ferreira Noronha, and Cirano J. Ulhoa. 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, K., S. Kanokmedhakul, V. Kukongviriyapa, and M. Isobe. 2001. “Application of *Chaetomium* Species (*Ketomium*®) as a New Broad Spectrum Biological Fungicide for Plant Disease Control: A Review Article.” *Fungal Diversity* 7 (January): 1–15.
- Stracquadanio, Claudia, Juan Manuel Quiles, Giuseppe Meca, and Santa Olga Cacciola. 2020. “Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by *Trichoderma*

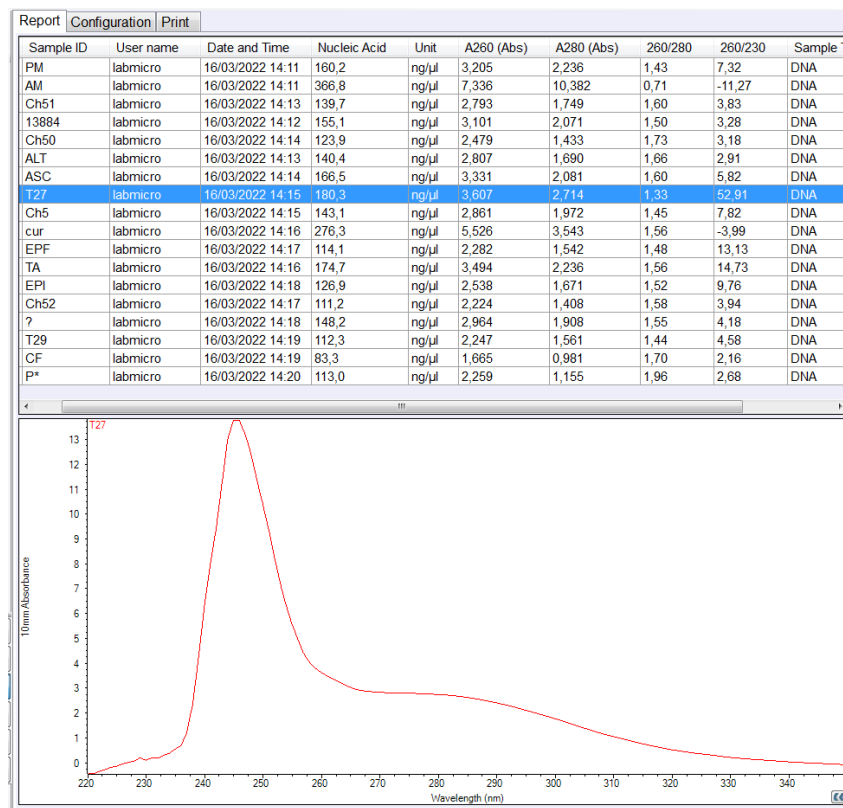
- Asperellum and Trichoderma Atroviride in Liquid Medium.” *Journal of Fungi* 6 (4): 1–18. <https://doi.org/10.3390/jof6040263>.
- Taguiam, John Darby, Edzel Evallo, and Mark Angelo Balendres. 2021. “Epicoccum Species: Ubiquitous Plant Pathogens and Effective Biological Control Agents.” *European Journal of Plant Pathology* 159 (4): 713–25. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02207-w>.
- Thambugala, Kasun M., Dinushani A. Daranagama, Alan J.L. Phillips, Sagarika D. Kannangara, and Itthayakorn Promputtha. 2020. “Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10 (November): 1–19. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>.
- Trivedi, Pankaj, Jan E. Leach, Susannah G. Tringe, Tongmin Sa, and Brajesh K. Singh. 2020. “Plant–Microbiome Interactions: From Community Assembly to Plant Health.” *Nature Reviews Microbiology* 18 (11): 607–21. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>.
- Tudi, Muyesaier, Huada Daniel Ruan, Li Wang, Jia Lyu, Ross Sadler, Des Connell, Cordia Chu, and Dung Tri Phung. 2021. “Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment.” *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>.
- Ulhoa, Cirano J., and John F. Peberdy. 1991. “Purification and Characterization of an Extracellular Chitobiase from Trichoderma Harzianum.” *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/BF02092032>.
- Větrovský, Tomáš, Miroslav Kolařík, Lucia Žifčáková, Tomáš Zelenka, and Petr Baldrian. 2016. “The Rpb2 Gene Represents a Viable Alternative Molecular Marker for the Analysis of Environmental Fungal Communities.” *Molecular Ecology Resources* 16 (2): 388–401. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12456>.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.” In *PCR Protocols*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Wightwick, Adam M., Mahabubur R. Mollah, Debra L. Partington, and Graeme Allinson.

2008. “Copper Fungicide Residues in Australian Vineyard Soils.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (7): 2457–64.  
<https://doi.org/10.1021/JF0727950>.

Williamson, Brian, Bettina Tudzynski, Paul Tudzynski, and Jan A.L. Van Kan. 2007. “Botrytis Cinerea: The Cause of Grey Mould Disease.” *Molecular Plant Pathology*.  
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>.

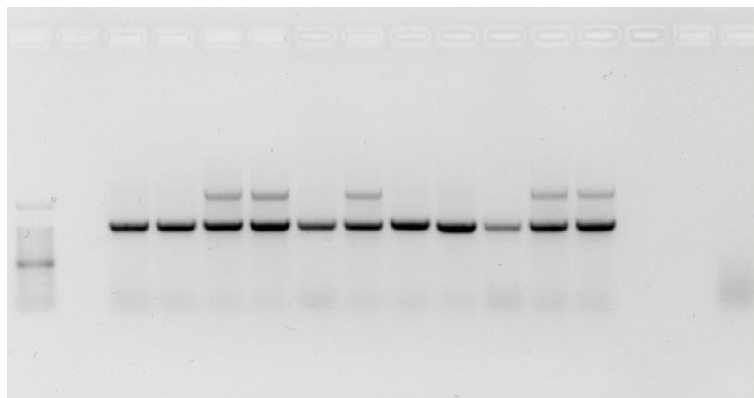
Zhang, Xinjian, Paul R. Harvey, Belinda E. Stummer, Rosemary A. Warren, Guangzhi Zhang, Kai Guo, Jishun Li, and Hetong Yang. 2015. “Antibiosis Functions during Interactions of *Trichoderma Afroharzianum* and *Trichoderma Gamsii* with Plant Pathogenic *Rhizoctonia* and *Pythium*.” *Functional and Integrative Genomics*.  
<https://doi.org/10.1007/s10142-015-0456-x>.

## MATERIAL SUPLEMENTARI

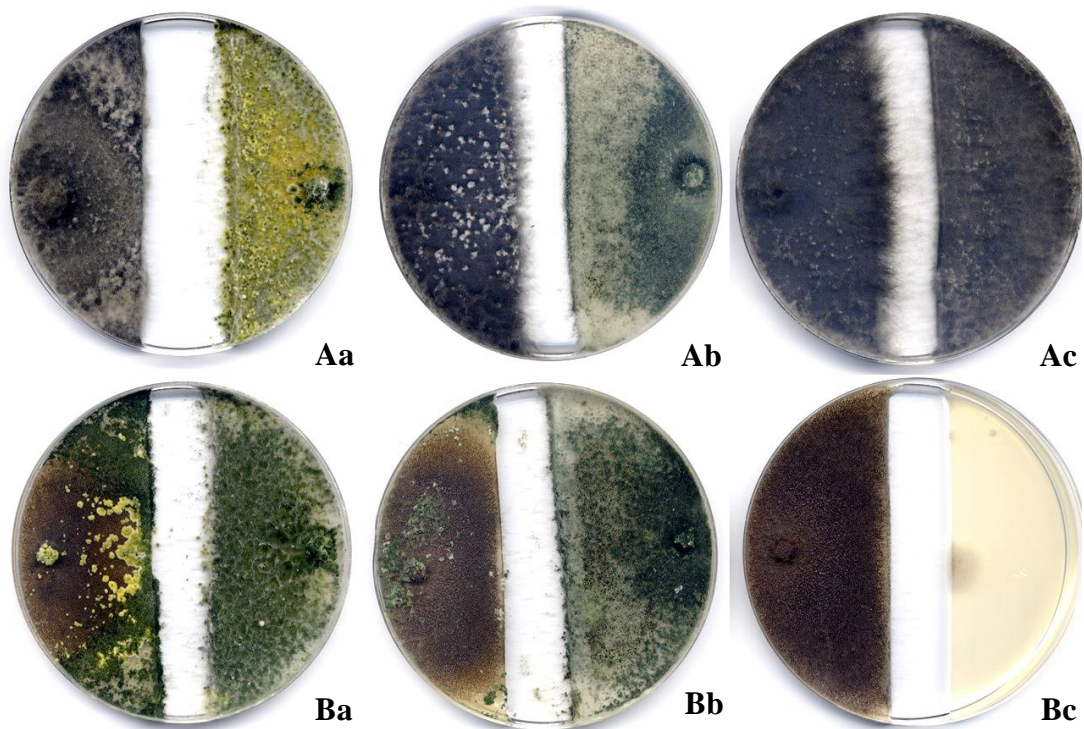


50

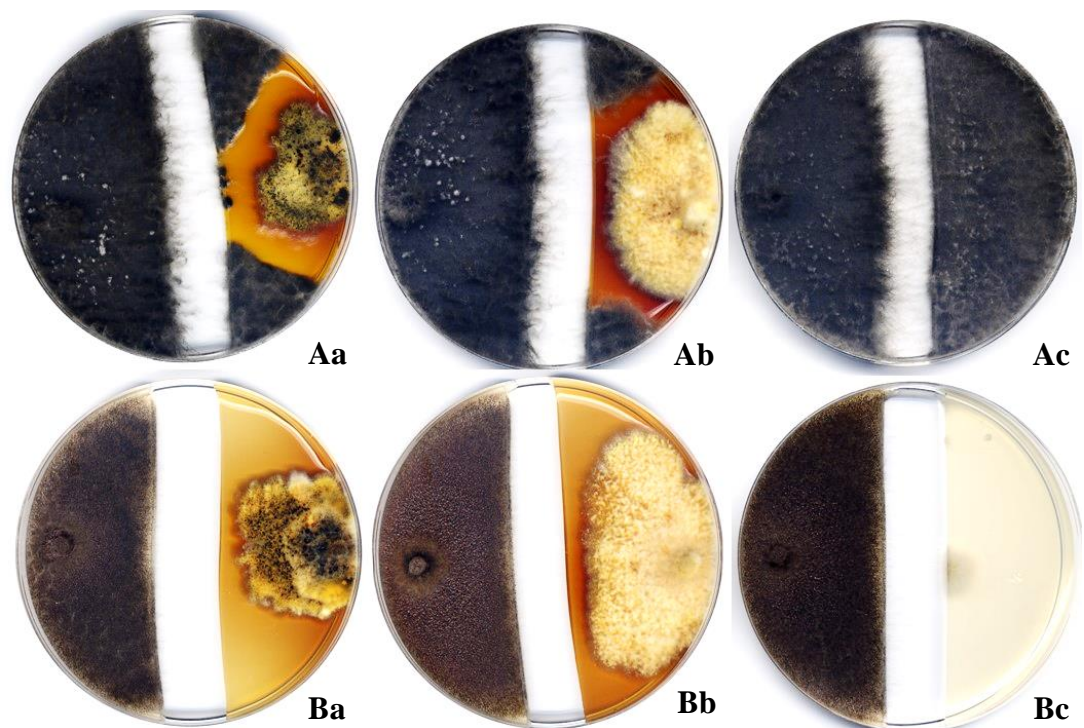
**Figura 1s. Interfície del software NanoDrop 2000.** Resultats de la quantificació d'ADN de les mostres d'extracció d'ADN. La primera columna correspon al codi d'identificació de la mostra, la quarta columna a la concentració d'ADN en ng/µl i la sisena columna a la qualitat (relació d'absorbància A260/A280). La qualitat de l'ADN s'accepta quan la relació A260/A280 es troba entre 1,9 i 2,1. A la part inferior es mostra el gràfic d'absorbància (Absorbància de la mostra respecte a la longitud d'ona en nanòmetres) de la mostra destacada en blau (T27).



**Figura 2s. Gel d'electroforesis resultant de l'amplificació del marcador RPB2 de diferents soques de *Trichoderma*.** Carril 1: marcador de pes molecular (PCR Sizer 100 bp DNA Ladder, Norgen Biotek Corp, Thorold, Canada). Carrils 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11: T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, T21. Carril 14: Control negatiu (Master Mix sense ADN).



**Figura 3s.** Cultiu dual en agar dividit de les soques de *Trichoderma* als 14 dies d'incubació. *Diplodia seriata* (A) i *Didymella glomerata* (B) en co-cultiu (a l'esquerra de cada placa) amb *Trichoderma atroviride* FMR 19306 (a), *Trichoderma harzianum* FMR 19312 (b) i el control (c).



**Figura 4s.** Cultiu dual en agar dividit de les soques d'*Epicoccum* als 14 dies d'incubació. *Diplodia seriata* (A) i *Didymella glomerata* (B) en co-cultiu (a l'esquerra de cada placa) amb *Epicoccum* sp. FMR 19856 (a), *Epicoccum nigrum* FMR 19857 (b) i el control (c).

**Taula 1s.** Espècies de *Trichoderma* aïllades i identificades en l'estudi amb el marcador *rpb2*. Dades obtingudes amb BLAST (GenBank). En verd, les espècies correctament identificades, en gris les identificacions presumptives, en vermell espècies no identificades molecularment i en blau aquelles que requereixen estudi filogenètic. ND: No determinat. Els codis marcats amb un asterisc (\*) corresponen a les soques escollides per als assajos *in vitro*.

Codi	FMR	ID	% identitat	Longitud de seqüència	Nº accés GenBank	Origen	Aïllament
<b>T1*</b>	19306	<i>T. atroviride</i> TRS638	99,42%	695 pb	KP009020	<b>Clos Mogador.</b> Compost amb femta de cavall	PCA 25°C
<b>T2</b>	19307	<i>T. guizhouense</i> S628	99,85%	661 pb	KJ665273	“	“
<b>T3</b>	19308	<i>T. koningiopsis</i> S359	99,75%	829 pb	KJ665285	<b>Clos Mogador.</b> Rizosfera <i>Vitis vinifera</i> , Garnatxa negra	“
<b>T4</b>	19309	<i>T. saturnisporum</i> DAOM:233997	97,71%	567 pb	KJ842205	“	“
<b>T5</b>	19310	<i>T. virens</i> ATCC 9645	98%	482 pb	KU933456.1	<b>Clos Mogador.</b> Compost amb femta de cavall	DRBC 25°C
<b>T6</b>	19311	<i>T. saturnisporum</i> DAOM:233997	97,10%	656 pb	KJ84220	<b>Clos Mogador.</b> Rizosfera coberta vegetal Syrah	PCA 25°C
<b>T7*</b>	19312	<i>T. harzianum</i> T3	100,00%	952 pb	MG917685.1	“	DRBC 25°C
<b>T8</b>	19313	<i>T. gamsii</i> PPRI 13817	99,10%	960 pb	MF043059.1	<b>Clos Mogador.</b> Rizosfera <i>Vitis vinifera</i> Syrah	PCA 25°C
<b>T9</b>	19314	<i>T. gamsii</i> PPRI 14674	99,56%	910 pb	MF043076.1	“	“
<b>T10</b>	19315	<i>T. harzianum</i> T3	99,49%	782 pb	MG917685.1	<b>Clos Mogador.</b> Compost vegetal	Ph- DRBC 25°C
<b>T11</b>	19316	<i>T. harzianum</i> T3	99,37%	949 pb	MG917685.1	<b>Clos Mogador.</b> Rizosfera <i>Vitis vinifera</i> , Garnatxa negra	“
<b>T12</b>	19317	<i>Trichoderma</i> spp.	ND	ND	ND	<i>Independent.</i> <b>OrtoVins.</b> Micopesticida ( <i>Trichoderma</i> ) propagat en arròs.	PCA 25°C

<b>T13</b>	19318	<i>Trichoderma</i> spp.	ND	ND	ND	<b>VerdCamp Fruits.</b> Rizosfera <i>Quercus ilex</i>	Ph-DRBC 25°C
<b>T14</b>	19546	<i>T. afroharzianum</i> TH33 IIPR	99,74%	780 pb	MN725763.1	<b>Clos Mogador.</b> Compost	“
<b>T15</b>	19547	<i>Trichoderma</i> spp.	ND	ND	ND	<b>VerdCamp Fruits.</b> Cultiu <i>Cucurbita pepo</i>	Ph-PCA 25°C
<b>T16</b>	19548	<i>T. koningiopsis</i> S359	99,50%	845 pb	KJ665285.1	<b>VerdCamp Fruits.</b> Rizosfera <i>Quercus ilex</i>	“
<b>T17</b>	19549	<i>T. harzianum</i> T3	97,56%	943 pb	MG917685.1	<b>Clos Mogador.</b> Fermentat d'ortiga	PCA 25°C 10 <sup>-2</sup>
<b>T18</b>	19550	<i>Trichoderma</i> spp.	ND	ND	ND	<b>VerdCamp Fruits.</b> Bosc <i>Pinus</i>	Ph-DRBC °15C
<b>T19</b>	19551	<i>T. longibrachiatum</i> DAOM:167674	99,74%	819 pb	KJ842212.1	<b>VerdCamp Fruits.</b> Cultiu <i>Prunus persica</i>	Ph-PCA 15°C
<b>T20</b>	19552	<i>Trichoderma</i> spp.	ND	ND	ND	<b>VerdCamp Fruits.</b> Cultiu <i>Cucurbita pepo</i>	Ph-DRBC °15C
<b>T21</b>	19682	<i>T. gamsii</i> PPRI 17304	99,15%	355 pb	MF043092.1	<b>Clos Mogador.</b> Finca Carinyena	DRBC 25°C 10 <sup>-3</sup>
<b>T22</b>	19683	<i>Trichoderma</i> spp.	ND	ND	ND	“	PCA 25°C 10 <sup>-3</sup>
<b>T23</b>	19684	<i>Trichoderma</i> spp.	ND	ND	ND	“	“
<b>T24</b>	19685	<i>Trichoderma</i> spp.	ND	ND	ND	<b>Clos Mogador.</b> Garnatxa i Syrah, Obagues	“
<b>T25</b>	19687	<i>T. gamsii</i> PPRI 17304	99,81%	519 pb	MF043092.1	Compost Johnson Su	“
<b>T26</b>	19688	<i>Trichoderma</i> spp.	ND	ND	ND	“	“
<b>T27</b>	19880	<i>Trichoderma</i> spp.	ND	ND	ND	<b>VerdCamp Fruits.</b> Cultiu <i>Cucurbita maxima</i>	PCA 15°C 10 <sup>-1</sup>
<b>T28</b>	19881	<i>T. harzianum</i> strain HZA11	99,35%	770 pb	MH647801.1	<b>VerdCamp Fruits.</b> Cultiu <i>Phaesolus vulgaris</i>	PCA 25°C 10 <sup>-1</sup>
<b>T29</b>	19882	<i>T. harzianum</i> strain MO-2014	98,27%	809 pb	KP009157.1	“	PCA 15°C 10 <sup>-3</sup>
<b>T30</b>	19883	<i>T. longibrachiatum</i> DAOM:167674	100%	380 pb	KJ842212.1	<i>Independent. OrtoVins.</i> Micopesticida ( <i>Trichoderma</i> ) propagat en arròs.	PCA 25°C

<b>T31</b>	19884	<i>T. afroharzianum</i> strain PPRI 14680	99,37%	797 pb	MF043078.1	<b>VerdCamp Fruits.</b> Cultiu <i>Cucurbita maxima</i>	PCA 15°C 10 <sup>-1</sup>
<b>T32</b>	19885	<i>T. harzianum</i> strain HZA11	99,38%	641 pb	MH647801.1	<b>VerdCamp Fruits.</b> Cultiu <i>Brassica oleracea</i> i <i>Foeniculum vulgare</i>	DRBC 15°C
<b>T33</b>	19886	<i>T. harzianum</i> strain T3	99,60%	753 pb	MG917685.1	<b>Clos Mogador.</b> Garnatxa i Syrah, Obagues	Ph-PCA 25°C

**Taula 2s.** Espècies d'*Epicoccum* aïllades i identificades en l'estudi amb el marcador *tub2*. Dades obtingudes amb BLAST (GenBank). Els codis marcats en verd corresponen a espècies correctament identificades i en gris a identificacions presumptives. ND: No determinat. Els codis marcats amb un asterisc (\*) corresponen a les soques escollides per als assajos *in vitro*.

Codi	FMR	ID	% identitat	Longitud de seqüència	Nº accés GenBank	Origen	Aïllament
<b>EPI*</b>	19856	<i>Epicoccum cf nigrum</i>	ND	ND	ND	<b>Clos Mogador.</b> “El maset” Teixit vegetal	SNA 25°C
<b>EPF*</b>	19857	<i>Epicoccum nigrum</i> strain P11	100%	265 pb	GU563380.1	<i>Independent.</i> “La Vermella” Fulla de vinya. Barberà de la Conca, 43422 (Tarragona)	Cambra humida
<b>EPN</b>	19959	<i>Epicoccum nigrum</i> strain CS7-2-1	100%	98 pb	MN262525.1	<i>Independent.</i> “La Vermella” Fulla de vinya. Barberà de la Conca, 43422 (Tarragona)	“

**ANNEX 1. Informe BeCrop de ‘Garnatxa Carretera’**

---

Informe de análisis del microbioma



#CFB003  
**Garnatxa Carretera**

📍 Tarragona

<b>SUELO</b> Desconocido	<b>CULTIVO</b> Uvas	<b>VARIEDAD</b> Garnatxa	<b>FECHA</b> 20-oct-2021
-----------------------------	------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Toda la información mostrada en este informe microbiano se basa en la presencia de detección de **571** diferentes especies



**1e+8 unidades/gr**  
Total Bacterias



**1e+7 unidades/gr**  
Total Hongos



**Sólo Ectomicorizas**  
Ratio Arbuscular-Ectomicoriza



**1:27.67**  
Ratio Hongo-Bacteria

RESUMEN

**Calidad de Suelo**

Calidad de Su... Biodiversidad Medio

Estado salud Funcionalidad Medio

**Salud** Resistencia **Muy alto**

**Nutrición**

C Biocontrol Medio

N Prod. hormo... **Alto**

P Adapt. estrés **Alto**

K Alto

**Distribución**

Distribución hongos por filo

- 47%** Basidiomycota
- 42%** Ascomycota
- 10%** Mortierellomycota

Distribución bacterias por filo

- 34%** Actinobacteriota
- 19%** Proteobacteria
- 8%** Firmicutes

**Rangos**

- No detectado
- Muy bajo
- Bajo
- Medio
- Alto
- Muy alto

CALIDAD DE SUELO

**Puntuación de calidad de suelo**  
**MEDIO**

<b>BIODIVERSIDAD</b>	<b>MEDIO</b>
<b>FUNCIONALIDAD</b>	<b>MEDIO</b>
<b>RESISTENCIA</b>	<b>MUY ALTO</b>

SALUD

SALUD MEDIO 4 Riesgos detectados

Estado de salud del cultivo en función de los patógenos detectados

**Riesgo Leve Detectado**



**BOTRYTIS**



MUY BAJO Nivel de riesgo



**ENFERMEDAD DE PETRI**



MUY BAJO Nivel de riesgo

PODREDUMBRE POR ASPERGILLUS • PODREDUMBRE POR CLADOSPORIUM

**No Detectado**

- OIDIO
- PODREDUMBRE POR ALTERNARIA
- MILDIU
- QUEMADURA DE HOJA ANGULAR / ROTBRENNER
- PODREDUMBRE DE RAÍZ POR ARMILLARIA
- YESCA
- PLAGA BACTERIANA
- BOTRYOSPHAERIA DIEBACK
- PIE NEGRO DE LA VID
- PODREDUMBRE DE RAÍZ POR DEMATOPHORA
- EUTIPIOSIS
- PODREDUMBRE POR MACROPHOMA
- PODREDUMBRE DE RAÍZ Y CORONA POR PHYTOPHTHORA
- TUMORES DE LA VID
- ENFERMEDAD DE PIERCE
- PODREDUMBRE MADURA
- PHOMOPSIS DIEBACK
- TEXAS PODREDUMBRE DE RAÍZ
- ANTRACNOSIS
- MARCHITO POR VERTICILLIUM
- PODREDUMBRE BLANCA

**Biocontrol**

AGENTES FUNGICIDAS **MEDIO**



AGENTES INSECTICIDAS **MEDIO**



AGENTES BACTERICIDAS **BAJO**



AGENTES NEMATICIDAS **MEDIO**

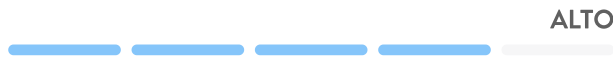


**HORMONE PRODUCTION**  
ALTO **3**  
Detectado

Potencial de fitohormonas basado en las especies detectadas

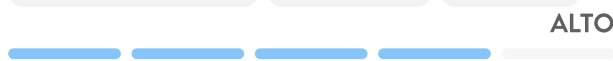
**PRODUCCIÓN DE AUXINAS (IAA)**

- DIVISIÓN CELULAR
- ELONGACIÓN DEL TALLO



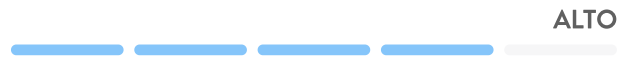
**PRODUCCIÓN DE GIBERELINAS (GA)**

- ELONGACIÓN DEL TALLO
- GERMINACIÓN
- FLORACIÓN



**PRODUCCIÓN DE CITOQUININAS (CK)**

- PROLIFERACIÓN CELULAR
- DIFERENCIACIÓN CELULAR

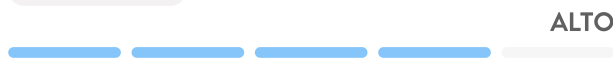


**STRESS ADAPTATION**  
ALTO **6**  
Detectado

Especies microbianas agrupadas en función de su relación con los metabolismos vinculados a la capacidad de soportar condiciones de estrés

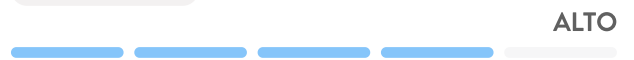
**PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS**

- BLOQUEO DE NUTRIENTES
- PROTEC. SALINIDAD
- PROTEC. SEQUÍA



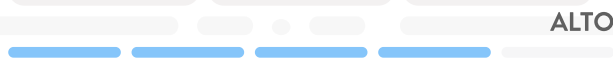
**ACC DEAMINASA (ACC-D)**

- PROTEC. PATÓGENOS
- PROTEC. SALINIDAD
- PROTECT. SEQUÍA



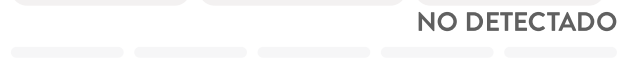
**SOLUBILIZACIÓN DE METALES PESADOS**

- BIOREMEDIACIÓN
- DETOXIFICACIÓN
- PROTEC. METALES



**ÁCIDO SALICÍLICO (SA)**

- PROTEC. SEQUÍA
- PROTEC. SALINIDAD
- PROTEC. METALES



**TOLERANCIA SALINIDAD**

- PROTEC. SALINIDAD
- POTENCIA CRECIMIENTO RAÍZ



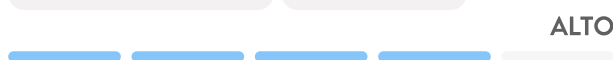
**ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA)**

- REGULACIÓN CRECIMIENTO
- RESISTENCIA DE PLANTA



**PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS**

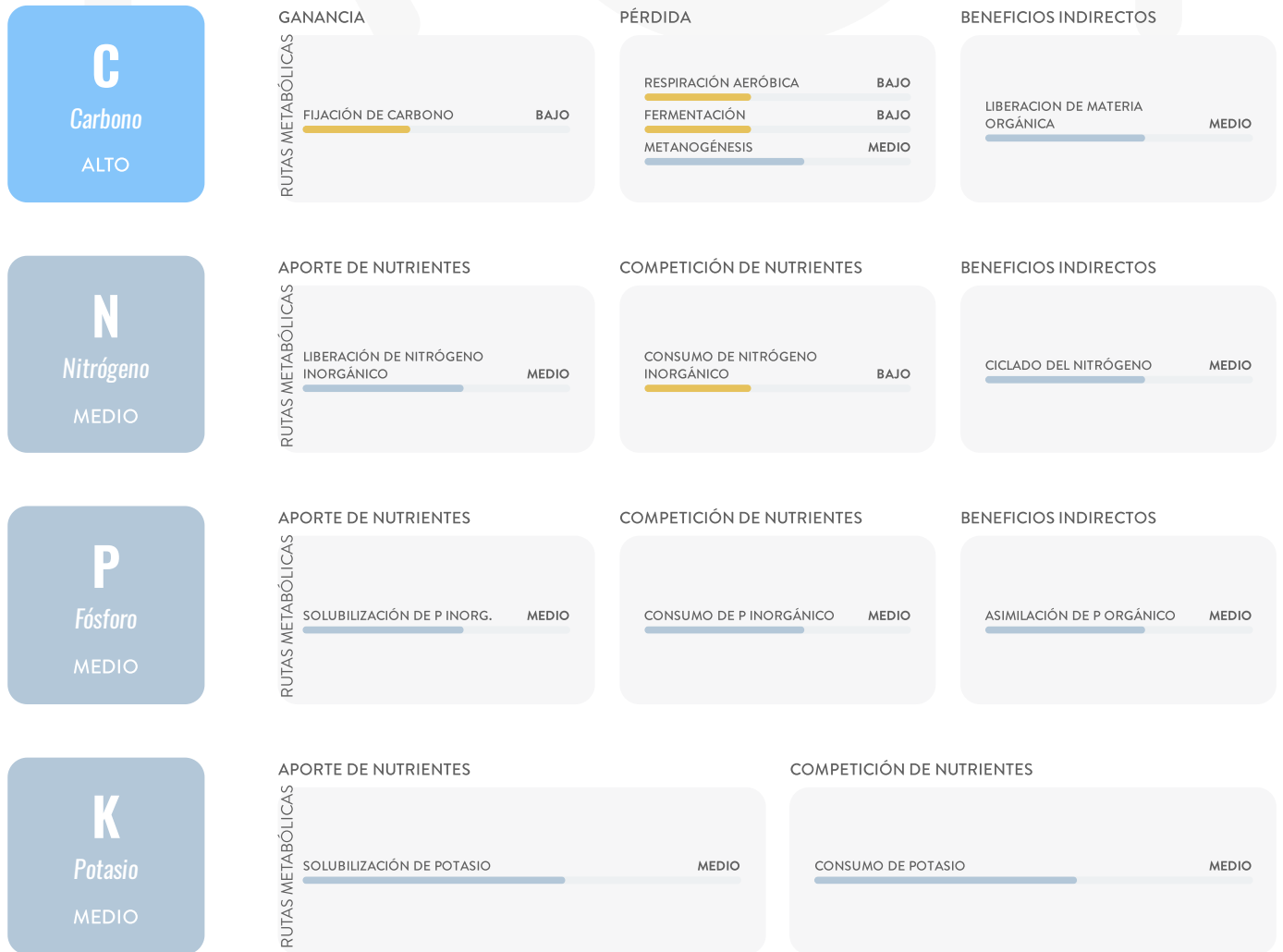
- MOVILIZACIÓN DE HIERRO
- BIOFERTILIZANTE



# NUTRICIÓN

Estado nutricional basado en la movilización microbiana de ciertos compuestos

## Compuestos Principales



## Compuestos Secundarios



# ANEXO

## PERFIL MICROBIOLÓGICO RELACIONADO CON EL VINO



Garnatxa Carretera


### PRESENCIA DE POTENCIADORES

Bacterias de ácido láctico  
NO DETECTADO

Levaduras No-Saccharomyces  
DETECTADO  
Un microorganismo encontrado

Levaduras Saccharomyces  
NO DETECTADO

 *Meyerozyma guilliermondii* • HONGO  
ALTO

 *Wickerhamomyces anomalus* • HONGO  
ALTO

### PRESENCIA DE RIESGOS

Problemas fermentativos  
NO DETECTADO

Brett  
NO DETECTADO

Bacterias de ácido acético  
NO DETECTADO

**COPYRIGHT © 2022 BIOME MAKERS INC. TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS**

Solo para fines de investigación, la información que ofrece dicho informe no debe tomarse como un consejo. No se base en la información de dicho documento como alternativa al asesoramiento agronómico de un profesional debidamente calificado. Biome Makers Inc. no se hace responsable de la toma de este informe como material orientativo tras cualquier pérdida en el negocio, incluyendo aquellas que no hayan supuesto pérdidas limitantes o hayan afectado a los beneficios, ingresos, producción, ahorros anticipados, negocios, contratos, oportunidades comerciales o de buena voluntad. Ninguna parte de este informe puede ser reproducida o utilizada para uso comercial o público sin permiso expreso de Biome Makers Inc.

***Los resultados de este informe son confidenciales y únicamente compartidos con el cliente***



Para cualquier duda o comentario sobre el informe, no dude en contactar con nosotros a través de

+1 (415) 795 7469

info@biomemakers.com



**ANNEX 2. Informe BeCrop de ‘Garnatxa Carretera’**

---

Informe de análisis del microbioma



#CFB004

## Bienvenido Carinyena



SUELO	CULTIVO	VARIEDAD	FECHA
Desconocido	Uvas	Carinyena	20-oct-2021

Toda la información mostrada en este informe microbiano se basa en la presencia de detección de **602** diferentes especies

**1e+8 unidades/gr**  
*Total Bacterias*

**1e+7 unidades/gr**  
*Total Hongos*



**1:28**  
*Ratio Arbuscular-Ectomicorriza*



**1:31.96**  
*Ratio Hongo-Bacteria*

## RESUMEN

**Calidad de Suelo**

Calidad de Su... Biodiversidad ● Bajo

Estado salud Funcionalidad ● Medio

**Salud** Resistencia ● Alto

**Nutrición**

C ● Medio

N ● Alto    P ● Bajo    K ● Bajo

**Distribución**

Distribución hongos por filo

- 50% Ascomycota
- 24% Mortierellomycota
- 20% Basidiomycota

Distribución bacterias por filo

- 36% Actinobacteriota
- 20% Proteobacteria
- 7% Firmicutes

**Rangos**

- No detectado
- Muy bajo
- Bajo
- Medio
- Alto
- Muy alto

## CALIDAD DE SUELO

Puntuación de calidad de suelo

ALTO

BIODIVERSIDAD	<b>BAJO</b>
FUNCIONALIDAD	<b>MEDIO</b>
RESISTENCIA	<b>ALTO</b>

## SALUD

SALUD

MEDIO

5

Riesgos detectados

Estado de salud del cultivo en función de los patógenos detectados

- Riesgo Leve Detectado**



BOTRYTIS



MUY BAJO Nivel de riesgo



ENFERMEDAD DE PETRI



MUY BAJO Nivel de riesgo



PIE NEGRO DE LA VID



MUY BAJO Nivel de riesgo

PODREDUMBRE POR ASPERGILLUS • PODREDUMBRE POR CLADOSPORIUM

- No Detectado**

OIDIO • PODREDUMBRE POR ALTERNARIA • MILDIU • QUEMADURA DE HOJA ANGULAR / ROTBRENNER •  
 PODREDUMBRE DE RAÍZ POR ARMILLARIA • YESCA • PLAGA BACTERIANA • BOTRYOSPHAERIA DIEBACK •  
 PODREDUMBRE DE RAÍZ POR DEMATOPHORA • EUTIPIOSIS • PODREDUMBRE POR MACROPHOMA •  
 PODREDUMBRE DE RAÍZ Y CORONA POR PHYTOPHTHORA • TUMORES DE LA VID • ENFERMEDAD DE PIERCE  
 • PODREDUMBRE MADURA • PHOMOPSIS DIEBACK • TEXAS PODREDUMBRE DE RAÍZ • ANTRACNOSIS •  
 MARCHITO POR VERTICILLIUM • PODREDUMBRE BLANCA

- Biocontrol**

AGENTES FUNGICIDAS **MEDIO**



AGENTES BACTERICIDAS **ALTO**



AGENTES INSECTICIDAS **ALTO**



AGENTES NEMATICIDAS **ALTO**



## HORMONE PRODUCTION

ALTO 3 Detectado

Potencial de fitohormonas basado en las especies detectadas

### PRODUCCIÓN DE AUXINAS (IAA)

- DIVISIÓN CELULAR
- ELONGACIÓN DEL TALLO



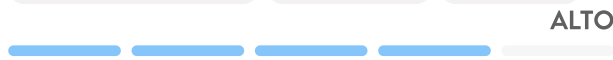
### PRODUCCIÓN DE CITOQUININAS (CK)

- PROLIFERACIÓN CELULAR
- DIFERENCIACIÓN CELULAR



### PRODUCCIÓN DE GIBERELINAS (GA)

- ELONGACIÓN DEL TALLO
- GERMINACIÓN
- FLORACIÓN



## STRESS ADAPTATION

MEDIO 6 Detectado

Especies microbianas agrupadas en función de su relación con los metabolismos vinculados a la capacidad de soportar condiciones de estrés

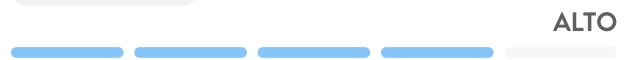
### PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS

- BLOQUEO DE NUTRIENTES
- PROTEC. SALINIDAD
- PROTEC. SEQUÍA



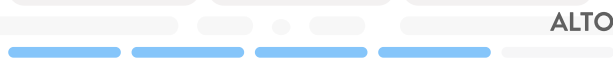
### ACC DEAMINASA (ACC-D)

- PROTEC. PATÓGENOS
- PROTEC. SALINIDAD
- PROTECT. SEQUÍA



### SOLUBILIZACIÓN DE METALES PESADOS

- BIOREMEDIACIÓN
- DETOXIFICACIÓN
- PROTEC. METALES



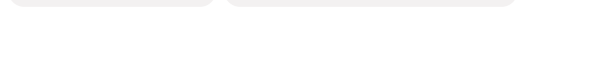
### ÁCIDO SALICÍLICO (SA)

- PROTEC. SEQUÍA
- PROTEC. SALINIDAD
- PROTEC. METALES



### TOLERANCIA SALINIDAD

- PROTEC. SALINIDAD
- POTENCIA CRECIMIENTO RAÍZ



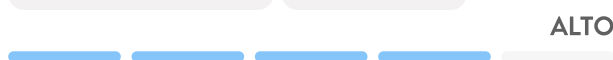
### ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA)

- REGULACIÓN CRECIMIENTO
- RESISTENCIA DE PLANTA



### PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS

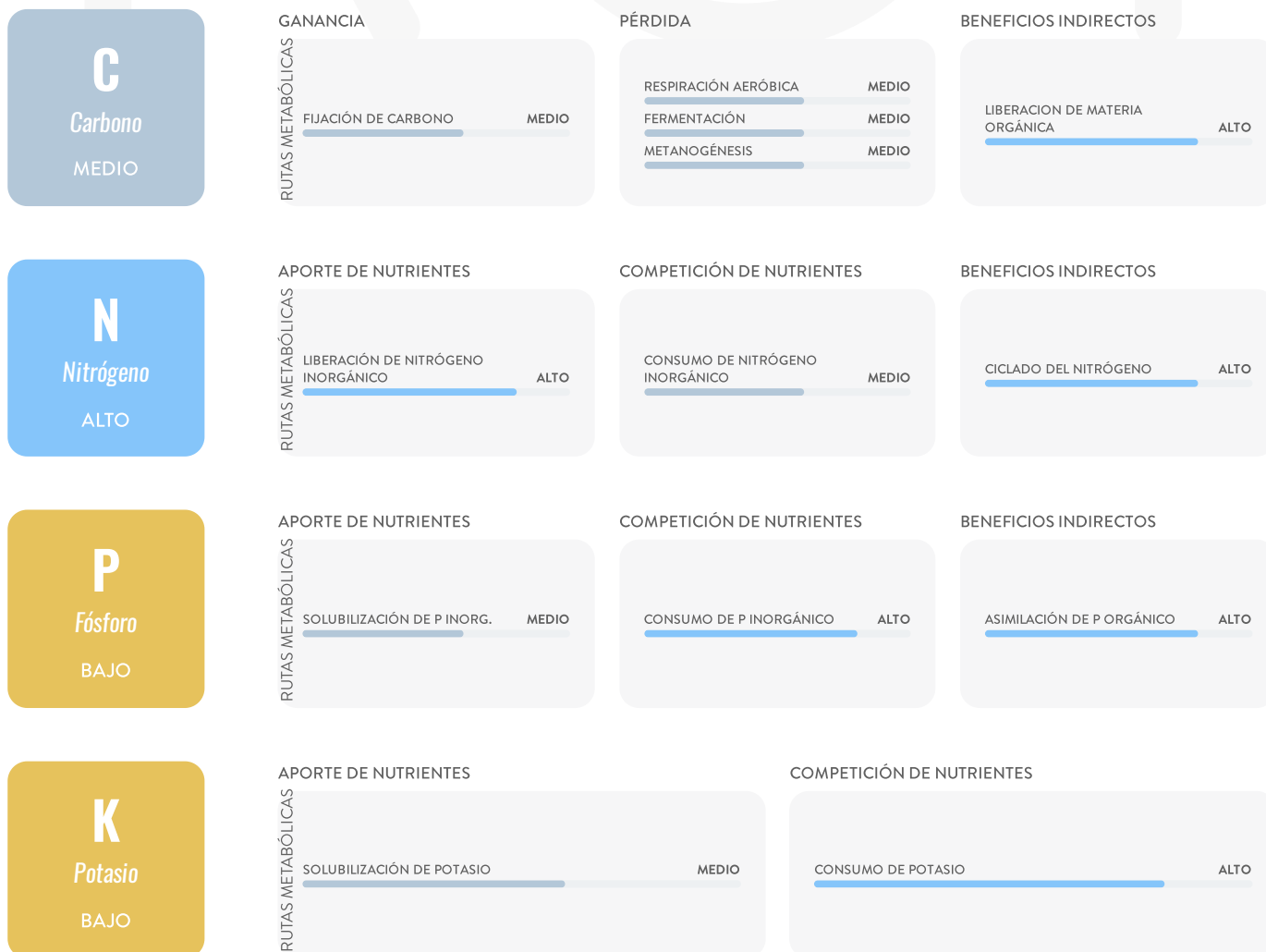
- MOVILIZACIÓN DE HIERRO
- BIOFERTILIZANTE



# NUTRICIÓN

Estado nutricional basado en la movilización microbiana de ciertos compuestos

## Compuestos Principales



## Compuestos Secundarios



# ANEXO

## PERFIL MICROBIOLÓGICO RELACIONADO CON EL VINO



Bienvenido Carinyena

### PRESENCIA DE POTENCIADORES

Bacterias de ácido láctico  
NO DETECTADO

Levaduras No-Saccharomyces  
NO DETECTADO

Levaduras Saccharomyces  
NO DETECTADO

### PRESENCIA DE RIESGOS

Problemas fermentativos  
NO DETECTADO

Brett  
NO DETECTADO

Bacterias de ácido acético  
NO DETECTADO

**COPYRIGHT © 2022 BIOME MAKERS INC. TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS**

Solo para fines de investigación, la información que ofrece dicho informe no debe tomarse como un consejo. No se base en la información de dicho documento como alternativa al asesoramiento agronómico de un profesional debidamente calificado. Biome Makers Inc. no se hace responsable de la toma de este informe como material orientativo tras cualquier pérdida en el negocio, incluyendo aquellas que no hayan supuesto pérdidas limitantes o hayan afectado a los beneficios, ingresos, producción, ahorros anticipados, negocios, contratos, oportunidades comerciales o de buena voluntad. Ninguna parte de este informe puede ser reproducida o utilizada para uso comercial o público sin permiso expreso de Biome Makers Inc.

***Los resultados de este informe son confidenciales y únicamente compartidos con el cliente***



Para cualquier duda o comentario sobre el informe, no dude en contactar con nosotros a través de

+1 (415) 795 7469

info@biomemakers.com

