

# TESIS DOCTORAL

## TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

**“Sustainable management of grapevine trunk diseases in vineyard: deliver biocontrol agents and associated molecules”.** Tesis Doctoral realizada bajo un acuerdo de cotutela entre la Universidad de Reims Champagne-Ardenne (URCA - Francia) y la Universitat Politècnica de València (UPV), con la participación del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV).

**DOCTORANDA:** Catarina Da Cunha Maia Leal

**PROGRAMA DE DOCTORADO:** Recursos y Tecnología Agrícolas (UPV); y Ciencias Agronómicas, Biotecnología Agroalimentaria, especialización en Bioquímica y biología Molecular (URCA).

**DIRECTORES:** Josep Armengol (Universitat Politècnica de València, UPV), David Gramaje (Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, ICVV), Florence Fontaine y Patricia Trotel-Aziz (Universidad de Reims Champagne-Ardenne, URCA).

**CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION:** Esta tesis doctoral se realizó en los laboratorios de los centros participantes ICVV, UPV y URCA. La financiación procedía de una Beca de la Region GRAND-EST y la ciudad de GRAND-REIMS (Francia) a través del programa de doctorado BIOVIGNE, contando también con el apoyo económico de BELCHIM Crop Protection.

**FECHA Y LUGAR DE LECTURA:** 8 de diciembre de 2022. Universidad de Reims Champagne-Ardenne

**COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL:** Philippe Jacques (Presidente), Marie-Claire Héloir (Secretaria), Alban Jacques (Vocal), Ales Eichmeier (Vocal)

**CALIFICACIÓN:** Sobresaliente *cum laude*.

## RESUMEN:

Las plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) están expuestas a una gran variedad de patógenos, como bacterias, virus, fitoplasmas, hongos y nematodos. Desde las etapas de vivero, las plantas de vid pueden estar infectadas con innumerables patógenos, que pueden causar enfermedades importantes. En la actualidad, las enfermedades fúngicas de la madera de la vid (Grapevine Trunk Diseases - GTDs) se encuentran entre los principales factores que limitan la productividad de este cultivo. Una vez las vides están infectadas, la productividad de la planta disminuye, provocando una muerte lenta o apoplética, que causa importantes pérdidas económicas y limita la sostenibilidad del viñedo. Con la creciente concienciación ambiental, los fungicidas de síntesis

química para el control de las GTDs se han reducido, dejando a los viticultores con pocos tratamientos efectivos disponibles. La investigación de agentes de control biológico (Biological Control Agents - BCAs) capaces de prevenir, o al menos minimizar, el impacto de las GTDs, se considera una prioridad de investigación. En esta Tesis Doctoral se caracterizó en profundidad un agente de biocontrol potencial y, junto con un producto comercial biológico ya registrado, ambos BCAs fueron probados contra varios patógenos agentes causales de GTDs, en invernadero bajo condiciones controladas, y también durante el proceso de propagación de la vid en vivero.

Los resultados del análisis genómico completo de *Bacillus subtilis* PTA-271 muestran un sistema funcional de motilidad de enjambre, una fuerte capacidad de supervivencia y un conjunto de genes que codifican sustancias bioactivas conocidas por estimular el crecimiento o las defensas de las plantas, influir en la microbiota beneficiosa y contrarrestar la agresividad de los patógenos. Cuando *B. subtilis* PTA-271 se probó contra *Neofusicoccum parvum* BT67 en plantas injertadas de invernadero, *B. subtilis* PTA-271 y *Trichoderma atroviride* SC1 demostraron que el cultivar contribuye a los efectos beneficiosos de Bs PTA-271 y Ta SC1 contra Np-Bt67. La aplicación simultánea de ambos BCAs demostró ser beneficiosa contra este patógeno en vides del cultivar Tempranillo. El análisis transcriptómico de las mismas muestras mostró ampliamente los cambios en la fisiología de la planta inducidos tanto por Bs PTA-271 como por Ta SC1 para proteger la vid ante la infección por Np-Bt67. En Chardonnay, las plantas infectadas con Np-Bt67 presentan genes sobreexpresados que están implicados en las vías de señalización del ácido absicico (ABA). En Tempranillo, la infección con Np-Bt67 provoca cambios de expresión en más de 200 genes, relacionados sobre todo con la importación de aminoácidos, procesos relacionados con el cloroplasto y el fotosistema, respuestas de la planta a estímulos bióticos y biosíntesis de metabolitos secundarios. La protección de Bs PTA-271 en Chardonnay implica a genes relacionados con la biosíntesis de ABA, las vías de los fenilpropanoides, los metabolitos secundarios, y la estructura y organización de la pared celular. La protección de Ta SC1 en las plantas de Tempranillo implica un mayor número de cambios, que abarcan tanto el metabolismo primario como el secundario, relacionados con cambios en las señales hormonales, como con el ácido absicico (ABA). Durante el proceso de producción de la vid en vivero, los resultados demostraron una reducción significativa del porcentaje de plantas infectadas con los patógenos asociados a las enfermedades de decaimiento por *Botryosphaeria* y Pie negro en el material de vivero tratado con Ta SC1 y Bs PTA-271 respectivamente. Los tratamientos simultáneos con ambos BCAs presentaron una reducción en el porcentaje de plantas infectadas con ambos tipos de patógenos.

En general, este estudio aportó nuevos conocimientos sobre el uso de uno o más BCAs contra varios patógenos asociados a las GTDs, tanto en el vivero como en vides adultas (viñedo). Además, se destacó el modo de acción de ambos BCAs en la protección de la vid. Por lo tanto, estos hallazgos proporcionan, no sólo una mejor comprensión de las interacciones entre los BCAs, la vid y los patógenos, sino que también son una fuerte contribución a una estrategia de gestión sostenible de las GTDs.



**La doctoranda, y algunos de los miembros del tribunal y directores después de la defensa de la tesis.** De izquierda a derecha: Philippe Jacques (Presidente), Marie-Claire Héloir (Secretaria), Patricia Trotel-Aziz (Codirectora), Catarina Da Cunha Maia Leal (Doctoranda), Florence Fontaine (Codirectora), Josep Armengol (Codirector) y Ales Eichmeier (Vocal).

**Trabajos derivados de la Tesis que ya han sido publicados:**

-Leal, C., Fontaine, F., Aziz, A., Egas, C., Clément, C., & Trotel-Aziz, P. (2021). Genome sequence analysis of the beneficial *Bacillus subtilis* PTA-271 isolated from a *Vitis vinifera* (cv. Chardonnay) rhizospheric soil: assets for sustainable biocontrol. *Environmental microbiome*, 16(1), 1-14.

-Leal, C., Richet, N., Guise, J. F., Gramaje, D., Armengol, J., Fontaine, F., & Trotel-Aziz, P. (2021). Cultivar contributes to the beneficial effects of *Bacillus subtilis* PTA-271 and *Trichoderma atroviride* SC1 to protect grapevine against *Neofusicoccum parvum*. *Frontiers in microbiology*, 2889.

-Leal, C., Gramaje, D., Fontaine, F., Richet, N., Trotel-Aziz, P., & Armengol, J. (2022). Evaluation of *Bacillus subtilis* PTA-271 and *Trichoderma atroviride* SC1 to control *Botryosphaeria* dieback and black-foot pathogens in grapevine propagation material. *Pest Management Science*. Doi 10-1002/ps.7339