

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL: Towards a sustainable viticulture: A toxicological, genetic and metabolomic exploration of the mechanism of action of basic substances against *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew in grapevine.

DOCTORANDO: Diego Llamazares de Miguel

DIRECTORAS: Dra. Ana M. Díez-Navajas (Investigadora Principal del área de viticultura del Departamento de Producción Vegetal de NEIKER) y Dra. Amaia Mena Petite (Profesora Agregada en el Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)).**CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION:** Esta tesis doctoral se realizó en NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, en su sede de Arkaute (Vitoria-Gasteiz, Araba). El doctorando disfrutó de un contrato predoctoral (00012-PIT2019-22) financiado por el Departamento de Desarrollo Económico, Sostenibilidad y Medio Ambiente del Gobierno Vasco para la formación de jóvenes investigadores y tecnólogos en el entorno científico-tecnológico y empresarial de la agricultura vasca, sector pesquero y alimentario, regulado por el Decreto 185 /2007, de 23 de octubre (sustituido por el Decreto 115/2021, del 23 de marzo).

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 29 de enero de 2024. Facultad de Farmacia, Vitoria-Gasteiz. UPV/EHU.

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL:

Presidenta: Dra. D^a Maite Lacuesta, Profesora Titular del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la UPV/EHU.

Secretario: Dr. D. Antonio Hernández, Profesor Agregado del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la UPV/EHU.

Vocal 1: Dra. D^a M^a del Carmen Martínez, Jefa del grupo Viticultura, Olivo y Rosa de la Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC).

Vocal 2: Dra. D^a Cristina Menéndez, Profesora Titular en el Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja e Investigadora responsable del grupo BREEDVITIS en el Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV).

Vocal 3: Dra. D^a Stéphanie Cluzet, Profesora Asociada en el grupo de Moléculas de Interés Biológico (MIB), de la Unidad Mixta de Investigación en Enología (UMR 1366 INRAE) del Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ISVV) de la Universidad de Bordeaux.



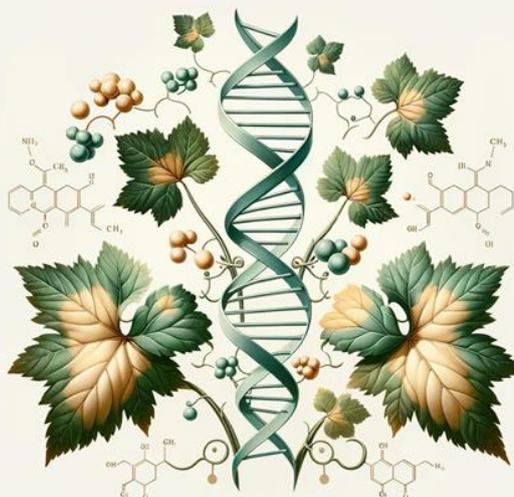
De izquierda a derecha: Dra D^a Maite Lacuesta (Presidenta), Dra D^a M^a del Carmen Martínez (Vocal), Dr D. Antonio Hernández (Secretario), Dra D^a Amaia Mena Petite (Co-Directora), Diego Llamazares (Doctorando y actual Doctor), Dra D^a Stéphanie Cluzet (Vocal), Dra. D^a Cristina Menéndez (Vocal), Dra D^a Ana M. Díez Navajas (Directora).

CALIFICACIÓN: La tesis, con mención internacional, recibió la calificación Sobresaliente *cum laude* con opción a Premio Extraordinario.

PhD thesis

Towards a sustainable viticulture:

A toxicological, genetic and metabolomic exploration of the mechanism of action of basic substances against *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew in grapevine



Diego Llamazares de Miguel

2023



©2023 Diego Llamazares DeMiguel

RESUMEN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una especie de planta leñosa y trepadora, mundialmente conocida gracias a su fruto, la uva. Hoy en día, su superficie de cultivo se extiende a unas 7.3 millones de hectáreas a nivel mundial, que equivalieron a unos 80 millones de toneladas de uva producidas en 2022. La mayor parte de esta producción se destina a la elaboración de vino (34.1 millones de toneladas) o uva de mesa (31.5 millones de toneladas), dedicándose la restante superficie a la producción de zumo y uvas pasas. En el caso de Europa, la gran mayoría de la uva es utilizada para la producción de vino. España, Francia e Italia son los tres países mejor situados tanto en superficie de viñedo como en producción de vino y beneficio económico generado. Más concretamente, en España la industria vitivinícola generó 23.700 millones de euros en 2019, lo que supuso un 2.2% del valor añadido bruto de ese año.

Por tanto, resulta de vital importancia proteger el viñedo frente a cualquier amenaza que pudiera causar la pérdida de la uva, tales como eventos meteorológicos extremos o enfermedades. Una de las enfermedades más importantes de la vid a nivel mundial es el

mildiu, producida por el oomiceto biotrófo obligado *Plasmopara viticola* (Berk. & Curtis) Berl. & de Toni, cuyos síntomas más comunes de la enfermedad incluyen la aparición de esporulación (con aspecto de césped blanquecino) en el envés de la hoja y de manchas amarillentas en el haz. Sin embargo, la gravedad de esta enfermedad radica en la capacidad del patógeno de infectar la uva en etapas tempranas, generando la pérdida del fruto y causando grandes pérdidas económicas.

Existen diversas formas de evitar la infección de mildiu. Por un lado, se encuentran las técnicas agronómicas que buscan una reducción de la humedad ambiental, generando un ambiente menos favorable para el desarrollo del patógeno. Por otro lado, están los fitosanitarios convencionales, básicamente fungicidas y productos formulados con base de cobre, que atacan directamente al patógeno. Su eficacia es muy alta y los convierte en la medida de control más habitual. Sin embargo, estos productos suponen un grave problema ambiental, ya que pueden acumularse en los ecosistemas, generando problemas de toxicidad en la flora y fauna del lugar. La tendencia de los mercados hacia productos más sostenibles con el medio ambiente y la transición ecológica de la agricultura hacen que los productos alternativos a los fitosanitarios cobren una especial relevancia, existiendo múltiples alternativas dentro del marco de legislación europeo. Entre éstas están las sustancias activas de bajo riesgo y las sustancias básicas, descritas en el Reglamento (CE) No 1107/2009. La principal ventaja de estos productos es su menor toxicidad, pero sobre todo su mayor facilidad de aprobación y comercialización. Sin embargo, la existencia de estas sustancias contrasta con la falta de evidencia científica que apoye su uso, siendo especialmente escasa su información a nivel molecular.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el objetivo principal de esta tesis ha sido la búsqueda y evaluación de productos comerciales alternativos a los fitosanitarios convencionales frente a *P. viticola* y, principalmente, dilucidar su mecanismo de acción a nivel molecular. Para ello, se aplicó un enfoque multidisciplinar, evaluando tanto la toxicidad directa de los productos frente al patógeno como su capacidad de estimular las defensas naturales de las plantas, a nivel genético y metabólico. El análisis de esta capacidad estimuladora se eligió en base a la evidencia científica existente, que sugiere que los productos naturales de origen vegetal serían capaces de estimular la inmunidad de las plantas.

Se empleó una batería de productos comerciales de bajo riesgo disponibles en el mercado y que estuvieran indicados para activar las defensas naturales de la vid. Se analizó la toxicidad de los productos frente a *P. viticola*. Para ello, esporangios y zoosporas del patógeno se pusieron en contacto directo con los productos comerciales a diferentes concentraciones y se analizó su efecto en la esporulación. Los resultados fueron claros, revelando que todos los productos resultaron tóxicos y disminuyeron la esporulación. Posteriormente se evaluó su capacidad estimuladora, desde dos enfoques distintos: uno genético donde se cuantificó la expresión de varios genes de defensa, y otro metabólico donde se analizaron todos los metabolitos presentes en la planta, con un especial enfoque en los compuestos fenólicos. En general, se observó que todos los productos fueron capaces de estimular las defensas de la vid en mayor o menor medida. Sin embargo, esta estimulación fue especialmente relevante a nivel genético. No así a nivel metabólico,

donde sólo uno de los productos testados y formulados en base a corteza de sauce destacó, y demostró una potente y completa capacidad estimuladora tanto a nivel genético como metabólico, y tanto en presencia como en ausencia del patógeno. De hecho, indujo la expresión de muchos de los genes estudiados y, sobre todo, la síntesis de metabolitos decisivos en la lucha frente a *P. viticola*, como estilbenos, flavonoides o la hormona ácido salicílico.

Por otro lado, se realizó un ensayo en condiciones controladas de invernadero donde plantas enteras se infectaron con esporangios de *P. viticola*, y fueron tratadas con los productos a evaluar. Fue de gran interés observar que varios de los productos redujeron la infección entre un 60 y un 80%, lo que demostró la capacidad de estos para prevenir la enfermedad incluso en una situación de alto riesgo.

Todos los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han permitido avanzar en el conocimiento del mecanismo de acción de los productos comerciales seleccionados compuestos por diferentes sustancias básicas. Los buenos resultados obtenidos sugieren que todos los productos analizados podrían ser una alternativa prometedora a los fungicidas, especialmente el extracto de sauce, y podrían integrarse en esquemas sanitarios sostenibles para el medio ambiente en viticultura.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Llamazares De Miguel, D.; Mena-Petite, A.; Díez-Navajas, A.M. 2022. Toxicity and Preventive Activity of Chitosan, Equisetum arvense, Lecithin and Salix Cortex against *Plasmopara viticola*, the Causal Agent of Downy Mildew in Grapevine. *Agronomy* 2022,12, 3139. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123139>