“Biocontrol de patógenos en campo: desarrollo de sistemas de detección precoz y herramientas de lucha integrada: PATBIOCONTROL”

Poscosecha

I ENCUENTRO POSCOSECHA

Grupo de Investigación Alimentos de Origen Vegetal de Aragón, Estación Experimental AULA DEI (EEAD – CSIC)

Viernes 17 de noviembre 2017

¿Cómo surge el proyecto?

✓ 1.000.000 ha viñas (MAGRAMA, 2013)

✓ *Botrytis*: uno de los patógenos de mayor incidencia

✓ Podredumbre gris: mayor causa de infección en los viñedos de todo el mundo (elevada resistencia a los fungicidas)

✓ Pérdidas causadas por Botrytis en los viñedos: 15-40% (condiciones climáticas)

✓ Costes económicos: mas de 15.000 millones de euros/año, perdiéndose el 25% de la facturación potencial

✓ Coste de los tratamientos de fungicidas contra Botrytis: 540 millones de euros/año (10% del mercado de fungicidas a nivel mundial)

TÍTULO: *"Biocontrol de patógenos en campo: desarrollo de sistemas de detección precoz y herramientas de lucha integrada"*. **PATBIOCONTROL**

CONVOCATORIA: RETOS-COLABORACIÓN (GOBIERNO DE ESPAÑA · MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN)

LÍDER DEL CONSORCIO: Bodegas San Valero

Socios: *Xtrem Biotech, Universidad de Zaragoza y Fundación Parque Científico Tecnológico Aula Dei*

PRESUPUESTO TOTAL: 319 953 €

Nº participante	Entidad	Tipo de entidad	%
1	Bodegas San Valero (BSV)	PYME	40
2	XTrem Biotech	SPIN OFF	20
3	Parque Científico Tecnológico Aula Dei (PCTAD)	OPI	18
4	Universidad de Zaragoza (UNIZAR)	OPI	22

DURACIÓN: 42 MESES

Fecha de inicio: 01/07/2015

Fecha de fin: 31/12/2018

OBJETIVO GENERAL: *desarrollo, en vid, de nuevas técnicas de diagnóstico precoz de patógenos (Botrytis) y de nuevos tratamientos de control biológico (basados en cepas de Bacillus aportadas por UNIZAR y XTREM BIOTECH) para dichos cultivos. Las técnicas de diagnosis junto la aplicación de los nuevos tratamientos se integrarán en un protocolo de control biológico alternativo al uso de fungicidas sintéticos.*

OBJETIVO GENERAL 1: DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNOSTICO PRECOZ DE PATÓGENOS

a) Selección del momento de muestreo

b) Cálculo del grado de infección (influencia de factores intrínsecos y extrínsecos)

c) Diseño de un modelo predictivo desarrollo enfermedad postcosecha

+

HERRAMIENTA DE DECISIÓN SENCILLA PARA LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS ESPECÍFICOS

+

OBJETIVO GENERAL 2: NUEVOS TRATAMIENTOS DE CONTROL BIOLÓGICO (BACILLUS)

a) estudio de efectividad y mecanismos de inhibición de las nuevas cepas de *Bacillus*

b) Optimización de la producción del agente de los agentes de biocontrol

c) Desarrollo del formulado y pruebas de eficacia

d) Diseño de tratamientos específicos en función del grado de infección

NO tratamiento en campo ← **NO** ← ¿NECESARIO TRATAMIENTO? → **SI** → **SI** tratamiento BIOCONTROL

RESULTADO FINAL: *elaboración de un nuevo protocolo de tratamiento en campo diseñado en función del grado de infección latente detectado y cuya integración en las prácticas de cultivo será sencilla y permitirá al sector ofertar un producto sano, sin residuos y adaptado a las nuevas exigencias comerciales. Para ello se optimizarán diferentes técnicas de detección temprana basadas en la utilización de herramientas de biología molecular al mismo tiempo que se diseña un nuevo agente de control biológico basado en la actividad antagonista de diferentes cepas de Bacillus spp frente a Botrytis*.

Detección precoz

Alto riesgo de infección

Bajo riesgo de infección

ABC BUZ14

FITOSANITARIO

ABC XTREM

Inoculación esporas *B. cinerea*

ABC BUZ14

FITOSANITARIO

ABC XTREM

Semanalmente:
Inspección visual signos de podredumbre
Día 0 y cada 15 días:
Detección por PCR
Análisis microbiológico

DOSIS DE AGENTES DE BIOCONTROL (ABC):

Producto desecado 1/50 y 1/100
Producto líquido: 1/50 y 1/200

PAPEL DE LOS SOCIOS:

La cooperativa productora (BSV) aporta su experiencia en el cultivo de la vid contribuyendo a la experimentación del proyecto con parcelas experimentales en las que se validarán los protocolos desarrollados y finalmente serán los socios viticultores (mas de 700) los que integren en sus prácticas habituales los desarrollos del proyecto.

SOCIO	LABOR EN EL PROYECTO
BSV SAN VALERO BODEGAS	- **Líder del proyecto** - **Estudio de prospección, selección de las parcelas de ensayo , variedades y seguimiento de las mismas** - **Recopilación de datos microclimáticos en las parcelas de ensayo.** - **Validación, a nivel de campo, del protocolo de detección precoz y modelo de predicción del grado de infección latente.** - **Participación, junto al resto de socios, en la última fase del proyecto de implantación del protocolo integrado de biocontrol.**

PAPEL DE LOS SOCIOS:

El papel de Xtrem será crítico ya que aportará su experiencia en elevar a nivel comercial los resultados de laboratorio obtenidos con bacterias, por ello sus tareas estarán centradas en la validación y extrapolación comercial de dos cepas de Bacillus, la aislada por Unizar y una cepa propiedad de Xtrem Biotech ya patentada.

SOCIO	LABOR EN EL PROYECTO
Xtrem biotech	- **Empresa participante** - **<u>Asesoramiento a UNIZAR</u> en la primera fase de caracterización y estudios de idoneidad de la cepa tipo de *Bacillus* como agente de biocontrol.** - **<u>Desarrollo del formulado</u>: producción del bioagente a escala piloto, definición del tipo de formulado.** - **Comparación de la efectividad de la cepa tipo de Bacillus a testar durante el proyecto con la de otras ya desarrolladas por XTrem Biotech.** - **Participación, junto al resto de socios, en la última fase del proyecto de implantación del protocolo integrado de biocontrol.**

PAPEL DE LOS SOCIOS:

Universidad Zaragoza

La Universidad de Zaragoza contribuye al proyecto además de con una extensa experiencia en microbiología, con los resultados preliminares de investigaciones previas en las que se ha aislado una nueva cepa de Bacillus con elevado potencial para la lucha biológica (elevada actividad antifúngica comprobada frente a Monilinia).

SOCIO	LABOR EN EL PROYECTO
Universidad Zaragoza	- Organismo de investigación - Caracterización y estudios de idoneidad de la cepa tipo de *Bacillus* como agente de biocontrol. - Estudio de la compatibilidad de la cepa tipo con otros fungicidas y con la cepa del preparado comercial de Xtrem Biotech. - Colaboración en los ensayos de desarrollo del formulado a escala de planta piloto y comercial. - Diseño, junto al PCTAD, de los tratamientos específicos en función del grado de infección latente determinado. - Participación, junto al resto de socios, en la última fase del proyecto de implantación del protocolo integrado de biocontrol

CERO residuos

European Commission

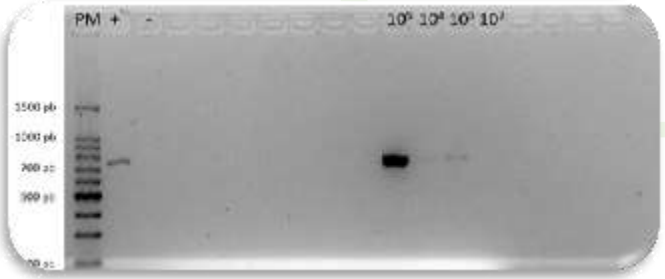
Life

PAPEL DE LOS SOCIOS:

FundaciónAulaDei
PARQUE CIENTÍFICO TECNOLÓGICO

La Fundación Parque Científico Tecnológico Aula Dei (PCTAD) aporta su experiencia en aplicación de protocolos de detección de infecciones latentes y de métodos rápidos de detección molecular (desde 2012 laboratorio de referencia en Aragón para la determinación de ausencia de Monilinia frutícola en los protocolos de exportación de fruta de hueso a Sudáfrica).

SOCIO	LABOR EN EL PROYECTO
	- **Organismo de investigación** - **Optimización de la técnica de biológica molecular para la identificación rápida de la infección latente.** - **Desarrollo del protocolo para la detección precoz, que incluye: momento y modo de muestreo, registro de datos climáticos necesarios y análisis complementarios.** - **Diseño de un modelo predictivo** - **Participación, junto al resto de socios, en la última fase del proyecto de implantación del protocolo integrado de biocontrol**



CERO residuos

European Commission

Life

Actividad 1: Selección de las parcelas y registro de datos

Participan…

Fundación AulaDei

SAN VALERO BODEGAS

Actividad 1: ESTUDIO DE PROSPECCIÓN, SELECCIÓN DE LAS PARCELAS Y SEGUIMIENTO DE LAS MISMAS

- Estudio de prospección y análisis de la incidencia según zonas y cultivos.
- Selección de parcelas, cultivos y variedades más adecuadas para el estudio.
- Seguimiento de los factores ambientales influyentes en el desarrollo *Botrytis*

Objetivos:

- **Seleccionar las parcelas y cultivares con mayor susceptibilidad al desarrollo de *Botrytis* en base a datos de campañas anteriores.**
- **Actividad transversal: seguimiento de las zonas de las parcelas seleccionadas (tratamientos, T y HR, etc.)**

Resultados esperados:

- **Selección de las variedades con mayor incidencia de *Botrytis*.**
- **Elección de las zonas de las parcelas de cultivo, que por su situación o condiciones edafoclimáticas, sean más suceptibles al desarrollo de *Botrytis*.**
- **Datos de temperatura media diaria y de duración del periodo de humectación durante las diferentes etapas del cultivo, que serán empleados para el diseño del modelo de predicción.**

Actividad 2: Desarrollo de un nuevo protocolo para la detección precoz de Botrytis

Participan…

Fundación AulaDei Parque Científico Tecnológico

SAN VALERO Bodegas BSV

Actividad 2: DESARROLLO DE UN NUEVO PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE *Botrytis*

Definición de los **límites de detección** de las técnicas de biología molecular a emplear (ensayos *in vitro*)

Optimización del método de detección precoz: selección del estado fenológico y otros factores relacionados con la infección latente

Validación del método optimizado en las parcelas seleccionadas

Objetivos:

- **Objetivo global: optimización del método de detección precoz e identificación de *Botrytis* mediante técnicas de biología molecular.**

Resultados esperados:

- **Optimización de una técnica rápida de biología molecular para la identificación de uvas con infección latente de *Botrytis*.**
- **Selección del estado fenológico más adecuado en la toma de muestras para la detección precoz.**
- **Obtención de un modelo de regresión lineal que describa la incidencia de infecciones latentes en función de factores intrínsecos (humedad de los frutos del aclareo o perfil fenólico) o factores extrínsecos (parámetros ambientales).**

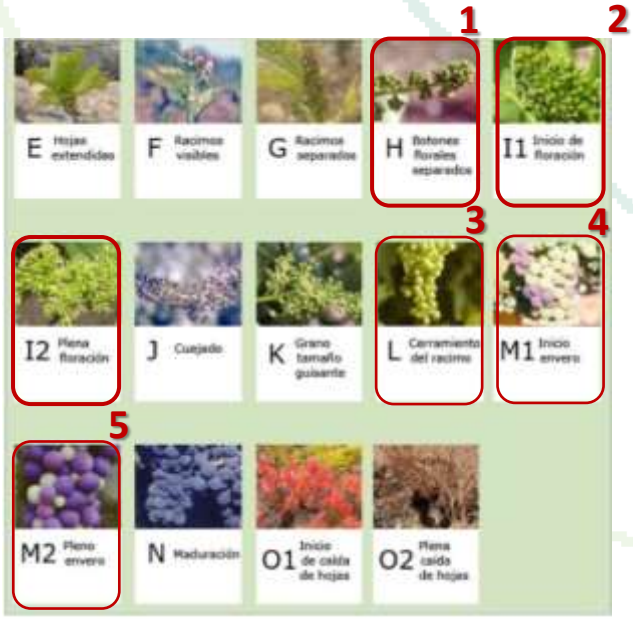
Actividad 2: Desarrollo de un nuevo protocolo para la detección precoz de Botrytis

Tarea2.2. Optimización del método de detección precoz a nivel de laboratorio.

- *Subtarea 2.2.1. Selección del **estado fenológico** más adecuado para la detección precoz*

Diseño experimental y plan de trabajo:

2º. Toma de muestras en los diferentes estados fenológicos



	FECHA DE MUESTREO	
ESTADO FENOLÓGICO	Garnacha	Macabeo
1. BOTON FLORAL (H)	03/06/16	03/06/16
2. INICIO-PLENA FLORACIÓN (I1I2)	10/06/16	10/06/16
3. CERRAMIENTO DE RACIMO (L)	11/07/16	11/07/16
4. INICIO ENVERO (M1)	19/08/16	22/08/16
5. PLENO ENVERO (M2)	...	

Actividad 2: Desarrollo de un nuevo protocolo para la detección precoz de Botrytis

Tarea2.2. Optimización del método de detección precoz a nivel de laboratorio.

- *Subtarea 2.2.1. Selección del **estado fenológico** más adecuado para la detección precoz*

Diseño experimental y plan de trabajo:

3º. Distribución de lotes y comienzo de ensayos

H. Botón floral

I1,I2. Inicio-plena floración

L. Cerramiento del racimo

M1. Inicio envero

100-150 racimos

Se han detectado 2 momentos de riesgo que coincidieron con un mayor grado de infección: la época de floración-cuajado y la época de vendimia. En general, la afección de Botrytis observada en campo en las campañas 2016 y 2017 ha sido baja (comparada con la detectada durante la campaña anterior, en 2015).

factores influir en

les totales

Tarea 2.1. técnica de

Actividad 2: Desarrollo de un nuevo protocolo para la detección precoz de Botrytis

Tarea2.2. Optimización del método de detección precoz a nivel de laboratorio.

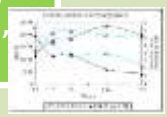
TIEMPO ESTIMADO: 22 horas
COSTE MATERIALES: 5 EUROS (SIN DESPLAZAMIENTO)

Actividad 3: Desarrollo de estrategias de control biológico mediante Bacillus

Aislamiento de ABC (BUZ14) con elevada actividad antifúngica *in vitro*

Tarea 3.1. Caracterización del ABC

- Dinámica poblacional y actividad a distintas Tª, pHs, humedad, UV.



- Compatibilidad con fungicidas

- Determinación del modo de acción

Tarea 3.2. Optimización de la producción del ABC

- Determinar medio de bajo coste adecuado
- Producción en biofermentador y pruebas de eficacia

Tarea 3.3. Desarrollo del formulado y ensayos de eficacia

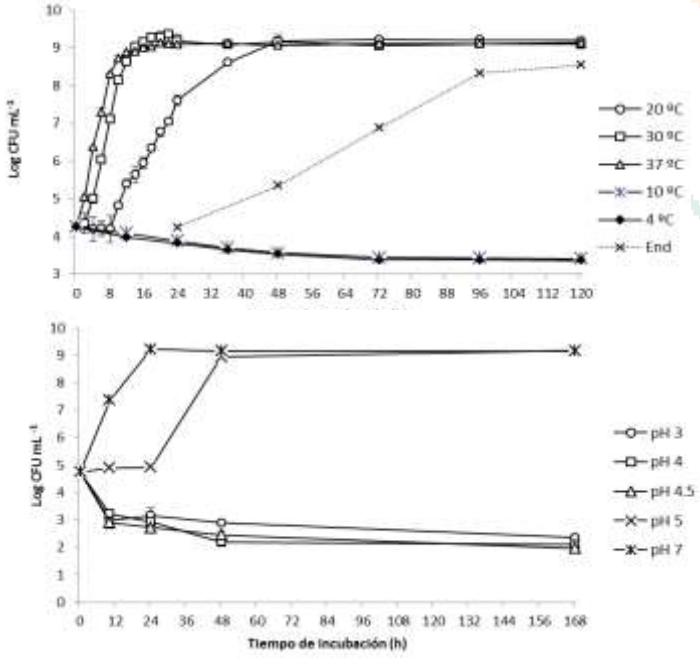
- Producción cultivo a escala industrial
- Ultrafiltración y Desecado
- Cultivo líquido
- Estudio de vida útil
- Actividad antifúngica de los formulados (BUZ14 y Xtrem)

Actividad 3: Desarrollo de estrategias de control biológico mediante Bacillus

Tarea 3.1. Caracterización de la cepa de Bacillus BUZ-14 y definición de su idoneidad como agente de biocontrol

Subtarea 3.1.1. Caracterización del crecimiento

B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum



Subtarea 3.1.2. Compatibilidad con fungicidas

PESTICIDAS COMERCIALES	Concentración inhibitoria (g-mL/100 mL)	DILUCIÓN DE LA DOSIS DE REFERENCIA
Arius	0,025 (mL)	x2
Dynali	0,055 (mL)	x2
Flint	0,0137 (g)	x2
Vivando	0,0154 (mL)	x2
Cepsul Especial	4,1 (g)	x2
Audace	0,04 (mL)	x2
Runner	0,04 (mL)	x2
Apache	0,075 (mL)	x2
Collis	0,04 (mL)	/2
Luna Experience	0,026 (mL)	/4
Systhane	0,03 (mL)	/4
Closar LE	0,18 (mL)	/8
Armicarb	0,7 (g)	/10
Droxicuper-50	0,03 (g)	/10
Karathane Star	0,045(mL)	/20

Actividad 3: Desarrollo de estrategias de control biológico mediante Bacillus

Tarea 3.1. Caracterización de la cepa de Bacillus BUZ-14 y definición de su idoneidad como agente de biocontrol

Subtarea 3.1.3. Determinación del modo de acción

Tratamiento	% inhibición
Cél. vegetativas 24 h	52,0 ± 10,9
Endosporos 48 h	60,5 ± 6,3
Endosporos 72 h	65,4 ± 7,2
Endosporos 96 h	97,0 ± 2,4
Endosporos 120 h	92,1 ± 4,7
Sobrenadante 24 h	100,0 ± 0,0
Sobrenadante 48 h	100,0 ± 0,0
Sobrenadante 72 h	100,0 ± 0,0
Sobrenadante 96 h	100,0 ± 0,0

Fracción	Agente de biocontrol	Tiempo (h)	Halo de inhibición (mm)
Fracción lipopeptídica	BUZ-14	24	0.0 ± 0.0a,A [a]
		48	5.4 ± 1.0b,A
		72	7.1 ± 0.7c,A
		96	6.9 ± 0.8c,A
		120	7.2 ± 0.5c,A
	FZB42	24	0.0 ± 0.0a,A
		48	6.5 ± 0.7b,A
		72	6.0 ± 1.0b,A
		96	5.8 ± 0.4b,B
		120	6.3 ± 1.2b,A
Fracción no butanólica	BUZ-14	24	0.0 ± 0.0a,A*
		48	7.7 ± 0.7c,A
		72	6.9 ± 0.4b,A*
		96	7.5 ± 0.5bc,A
		120	7.8 ± 0.4c,A
	FZB42	24	6.5 ± 0.8ab,B*
		48	7.3 ± 0.7bc,A
		72	6.1 ± 0.7a,B*
		96	7.7 ± 0.8bc,A
		120	8.1 ± 0.3c,A
Sobrenadante	BUZ-14	24	4.3 ± 0.5a,A*
		48	7.1 ± 0.8b,A
		72	9.3 ± 0.7c,A*
		96	9.5 ± 0.7c,A*
		120	9.7 ± 0.7c,A*
	FZB42	24	9.0 ± 0.7a,B*
		48	8.4 ± 0.8a,B
		72	11.2 ± 0.7b,B*
		96	11.5 ± 0.8b,B*
		120	11.7 ± 0.6b,B*

Actividad 3: Desarrollo de estrategias de control biológico mediante Bacillus

Tarea 3.1. Caracterización de la cepa de Bacillus BUZ-14 y definición de su idoneidad como agente de biocontrol

Subtarea 3.1.3. Determinación del modo de acción

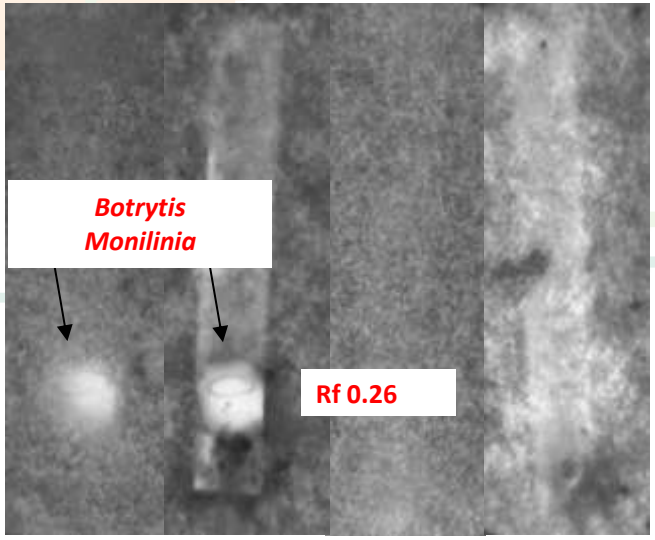
Cromatografía de capa fina de la fracción lipopéptidica

SURFACTINAS

ITURINAS

FENGICINAS

Cromatografía de capa fina-bioautobiografía de la fracción lipopéptidica

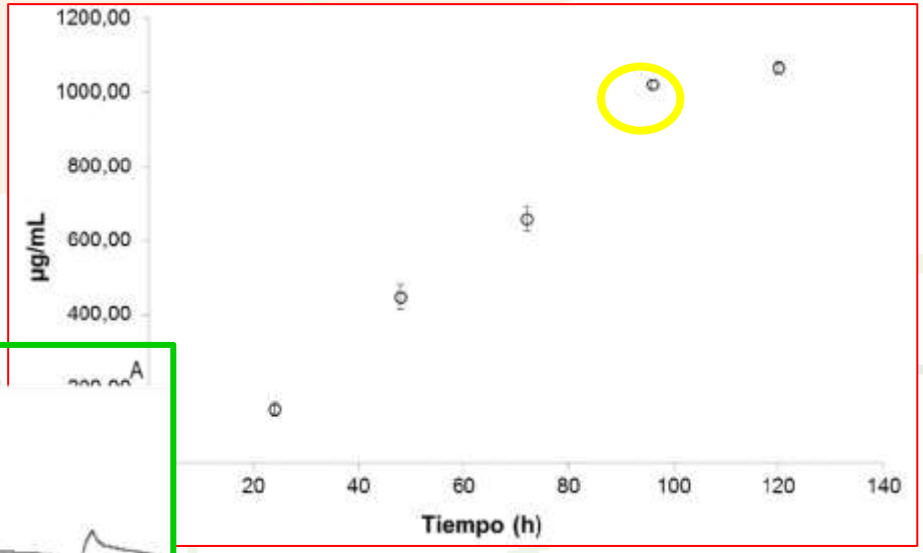


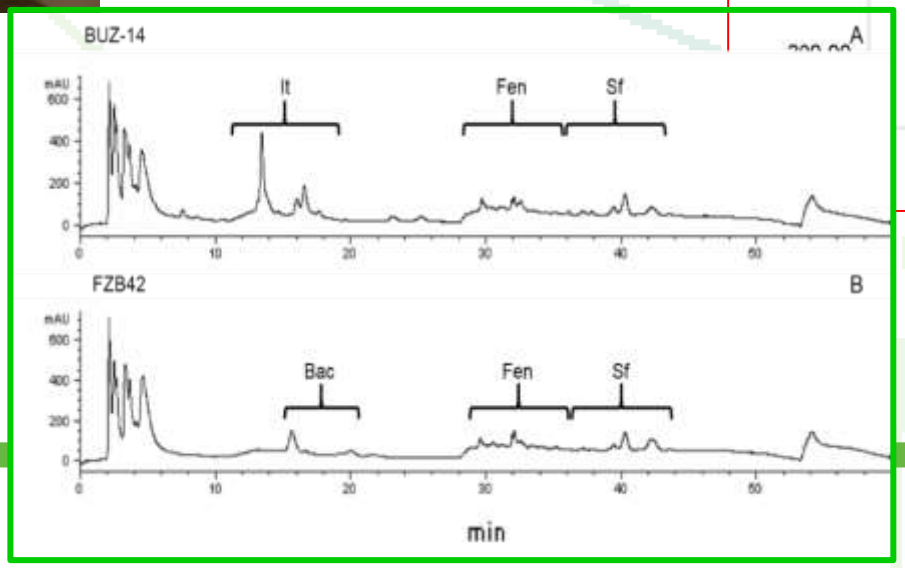
BUZ-14 FZB42

Actividad 3: Desarrollo de estrategias de control biológico mediante *Bacillus*

Tarea 3.1. Caracterización de la cepa de Bacillus BUZ-14 y definición de su idoneidad como agente de biocontrol

Subtarea 3.1.3. Determinación del modo de acción



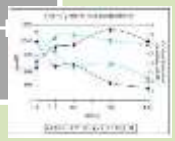


Actividad 3: Desarrollo de estrategias de control biológico mediante *Bacillus*

Que hemos hecho durante 2017…

Tarea 3.1. Caracterización del ABC

- Dinámica poblacional y actividad a distintas Tª , pH humedad, UV.



- Compatibilidad con fungicidas

- Determinación del mo de acción

Tarea 3.2. Optimización de la producción del ABC

- Determinar medio de bajo coste adecuado
- Producción en biofermentador y pruebas de eficacia

Tarea 3.3. Desarrollo del formulado y ensayos de eficacia

- Producción cultivo a escala industrial
- Ultrafiltración y Desecado
- Cultivo líquido
- Estudio de vida útil
- Actividad antifúngica de los formulados (BUZ14 y Xtrem)

1ª aplicación junio → 2ª aplicación julio (lluvias)

Supervivencia de los formulados en el viñedo

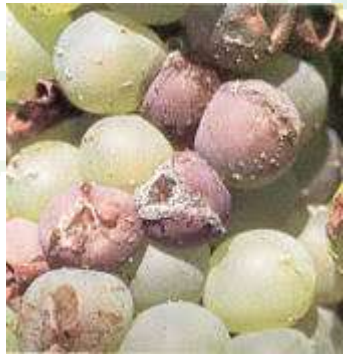
Días muestreo	**BUZ-14** (log UFC/g)	**Xt1** (log UFC/g)
Día 1	**Tratamiento**	
	7,68	**7,89**
Día 7	**6,16**	**6,89**
Día 25	**Tratamiento (lluvias)**	
	7,74	**7,79**
Día 40	**7,55**	**7,45**
Día 80	**6,57**	**6,49**

Incidencia en campo

Tratamiento	Incidencia Oídio (%)
BUZ-14	3,75
Xt1	12,5
Control	17,1

Incidencia en laboratorio

Tratamiento	Incidencia *Botrytis* (%)	Incidencia Oídio (%)
BUZ-14	**2**	**8**
Xt1	**2**	**18**
Control	**4**	**18**



Proyecto PATBIOCONTROL: *"Biocontrol de patógenos en campo: desarrollo de sistemas de detección precoz y herramientas de lucha integrada"*

Universidad Zaragoza
1542

Mª Eugenia Venturini
Universidad de Zaragoza
ugeventu@unizar.es