



**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE AISLADOS NATIVOS DE *Bacillus*, *Trichoderma* Y *Streptomyces* CON POTENCIAL PARA EL BIOCONTROL DE LOS HONGOS DE LA MADERA DE LA VID †**

**[ISOLATION, IDENTIFICATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF NATIVE ISOLATES OF *Bacillus*, *Trichoderma* AND *Streptomyces* WITH POTENTIAL FOR THE BIOCONTROL OF GRAPEVINE TRUNK FUNGI]**

**Arturo Morales-Pizarro<sup>1\*</sup>, Javier Javier-Alva<sup>1</sup>, L.A. Álvarez<sup>2</sup>, Rocío Mayta-Obos<sup>3</sup>, René Aguilar-Ancota<sup>1</sup>, Ricardo Peña-Castillo<sup>1</sup>, Roger Chanduvi-García<sup>1</sup> and David Lindo-Seminario<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Piura, Campus Universitario s/n. Urb. Miraflores. Piura, Perú. \*Email. dmoralesp@unp.edu.pe

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Cañete, Casa de la cultura, Av. Mariscal Benavides, San Luis de Cañete. Lima, Perú.

<sup>3</sup> Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Campus Universitario Av. Juan XXIII 424. Lambayeque, Perú.

<sup>4</sup> Estación Experimental Agraria Vista Florida. Subdirección de Recursos Genéticos de la Dirección de Recursos Genético y Biotecnología. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Av. Pisci. Lambayeque, Perú.

\*Corresponding author

## SUMMARY

**Background:** Biocontrol of grapevine trunk diseases (GTDs) is a friendly alternative to chemical control that cause resistance and contamination of the ecosystems. **Objective:** isolate native grapevine root and rhizosphere microorganisms with biocontrol potential of grapevine trunk fungi diseases. **Methodology:** The competition for substrate (CS) was studied with the Bell's scale, contact time (CT) between the antagonist-pathogen (days) and the growth inhibition percentage (GIP). **Results:** Seven *Trichoderma* strains were isolated (from roots: Tr-1, Tr-2, Tr-3, Tr-6; and from rhizosphere: Tr-4, Tr-5 Tr-7); six *Bacillus* spp. (from roots: Bac-4, Bac-5, Bac-6; and from rhizosphere: Bac-1, Bac-2, Bac-3); and two *Streptomyces* sp. (Act-1, Act-2). The CS results evaluated with the Bell scale showed Tr-1, Tr-7, T.atv (*Trichoderma atroviride*) and T-22 (*Trichoderma harzianum*) were placed in class 1 against *Lasiidiplodia theobromae* and, all isolates were placed in class 1 against *Campylocarpon pseudofasciculare* and *Phaeoacremonium parasiticum*. The CT of *Trichoderma* was 2 days (*L. theobromae*) and 3 days (*C. pseudofasciculare* and *P. parasiticum*). In the antibiosis test, Tr-5 (*Trichoderma*) and Bac-3 (*Bacillus*) had the highest GIP values (>50%) against the different evaluated pathogens. The isolate Act-2 (*Streptomyces* sp.) presented a GIP, >70% (*L. theobromae*), and >40% (*C. pseudofasciculare*) and >30% (*P. parasiticum*). **Implications:** The use of biological control in the management of grapevine trunk diseases is an effective tool, and can be integrated into an integrated management strategy for these pathologies. **Conclusions:** The native isolates Bac-3 (*Bacillus* spp.), Tr-5 (*Trichoderma* spp.), Act-2 (*Streptomyces* sp.) demonstrated *in vitro* control against the pathogens *L. theobromae*, *C. pseudofasciculare* and *P. parasiticum*, pathogens associated to grapevine trunk diseases.

**Keywords:** Antagonists; biocontrol; grapevine trunk fungi; rhizosphere; root; table grape.

## RESUMEN

**Antecedentes:** El biocontrol de las enfermedades fúngicas de la madera de la vid (EMV), es una alternativa amigable frente al control químico causante de resistencia y/o contaminación del ecosistema. **Objetivo:** aislar microorganismos nativos de raíz y rizósfera de vid con potencial de biocontrol de hongos de la madera de la vid. **Metodología:** Se estudió la “competencia por sustrato” (CS) con la escala de Bell, “el tiempo de contacto” (TC) entre antagonista-

† Submitted January 17, 2021 – Accepted April 20, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4206>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

**Authors ORCID =** Javier Javier-Alva: <https://orcid.org/0000-0002-4953-8165>; Luis Álvarez-Bernaola: <https://orcid.org/0000-0002-6174-9870>; Rocío Mayta-Obos: <https://orcid.org/0000-0002-7800-1447>; René Aguilar-Ancota: <https://orcid.org/0000-0002-3965-6096>; Ricardo Peña-Castillo: <https://orcid.org/0000-0001-9366-4962>; Roger Chanduvi-García: <https://orcid.org/0000-0002-6061-3007>; David Lindo-Seminario: <https://orcid.org/0000-0002-8767-5304>; Arturo Morales-Pizarro: <https://orcid.org/0000-0003-3966-6689>

patógeno” (días) y la antibiosis por el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC). **Resultados:** Se aislaron e identificaron: siete-cepas de *Trichoderma* spp. (raíz: Tr-1, Tr-2, Tr3, Tr-6; y rizósfera: Tr-4, Tr-5, Tr-7); seis-*Bacillus* spp. (raíz: Bac-4, Bac-5, Bac-6; y rizósfera: Bac-1, Bac-2, Bac-3); y dos-*Streptomyces* sp. (rizósfera: Act-1, Act-2). Los resultados de la CS evaluados con la escala de Bell demostraron a Tr-1, Tr-7, T.atv (*Trichoderma atroviride*) y T-22 (*Trichoderma harzianum*) se ubicaron en la clase 1 frente a *Lasiodiplodia theobromae* y, todos los aislados se ubicaron en la clase 1 frente a *Campylocarpon pseudofasciculare* y *Phaeoacremonium parasiticum*. El TC de *Trichoderma* fue 2 días (*L. theobromae*) y 3 días (*C. pseudofasciculare* y *P. parasiticum*). En la antibiosis Tr-5 (*Trichoderma*) y Bac-3 (*Bacillus*) tuvieron el mayor PIC (>50%) frente a los patógenos. El aislado Act-2 (*Streptomyces* sp.) presentó PIC, >70% (*L. theobromae*), >40% (*C. pseudofasciculare*) y >30% (*P. parasiticum*). **Implicaciones:** El uso del control biológico en el manejo de enfermedades de la madera de la vid es una herramienta eficaz, y puede integrarse en una estrategia de manejo integrado de estas patologías. **Conclusiones:** Los aislados nativos Bac-3 (*Bacillus* spp.), Tr-5 (*Trichoderma* spp.), Act-2 (*Streptomyces* sp.) demostraron control *in vitro* frente a los patógenos *L. theobromae*, *C. pseudofasciculare* y *P. parasiticum*, patógenos asociados a enfermedades de la madera de la vid. **Palabras clave:** Antagonistas; biocontrol; hongos de madera de la vid; rizósfera; raíz; uva de mesa.

## INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los frutales de mayor interés comercial a nivel mundial, permite el desarrollo socio-económico en diferentes países, y su importancia radica en la producción de vinos y consumo fresco; desarrollándose en los hemisferios norte y sur (30°-50° Latitud norte y sur) (Gramaje *et al.*, 2018). Los principales países productores son: China con 13.9 millones de toneladas (Mt), Italia 8.2 Mt, EE. UU. 6.5 Mt (FAO, 2019). Perú es el primer exportador de uva de mesa a nivel mundial (MINCETUR, 2022), y las principales regiones productoras son; Ica con 177 mil toneladas (mt) y Piura con 172 mt (Agraria, 2021). Sin embargo, este cultivo se ve seriamente amenazado por “las enfermedades fúngicas de la madera de la vid” (EMV), ocasionando importantes pérdidas económicas en la viticultura, altos costos de producción, y aumento de la incidencia de EMV resultado de las intensas prácticas agrícolas (Armengol *et al.*, 2021). La búsqueda de nuevas alternativas para el control de EMV ha aumentado, debido al gran impacto negativo en el ambiente (Karimi *et al.*, 2020). Diferentes estudios han demostrado que los ingredientes activos de los agroquímicos afectan la flora y fauna microbiana en la rizósfera, así también, generan la resistencia de los patógenos fúngicos (Dries *et al.*, 2021). El control biológico de los hongos patógenos responsables de las EMV está basado en el uso de microorganismos antagonistas de los géneros *Trichoderma* spp, *Bacillus* spp, *Streptomyces* sp. (Gramaje *et al.*, 2018; Dries *et al.*, 2021). Esta alternativa está siendo usada en la protección de heridas de poda y tratamientos foliares enfocados a reducir la incidencia de las EMV (Gramaje *et al.*, 2018; Dries *et al.*, 2021). Por otra parte, los aislados bacterianos *Bacillus mycoides*, *Burkholderia cepacia* y *Paenibacillus riograndensis* muestran características de control *in vitro* e *in vivo*, mediante la producción de enzimas hidrolíticas (Bach *et al.*, 2016).

Las EMV causan el declive y/o la muerte temprana en plantas tanto en vivero como en campo (plantas jóvenes menores a 5 años) como; pie negro, la

enfermedad de Petri, y la muerte regresiva (Claverie *et al.*, 2020). La enfermedad del pie negro, es causada por los géneros; *Cylindrocladiella*, *Neonectria*, *Ilyonectria*, *Dactylonectria*, *Thelonectria*, y *Campylocarpon*, genera un gran interés e importancia en las primeras etapas del cultivo (Langenhoven *et al.*, 2018). La enfermedad de Petri es causada por diferentes especies de *Phaeoacremonium* (*P.*) y *Phaeomoniella* (*Pa.*), representa en la actualidad un reto de manejo, debido a la dificultad de ubicación dentro los vasos xilemáticos de la planta (Battiston *et al.*, 2021). La muerte regresiva en vid es causada por diferentes especies de *Botryosphaeria* y sus anamorfos tales como; *Diplodia mutila*, *D. seriata*, *Neofusicoccum australe*, *N. parvum* y *Lasiodiplodia theobromae*, entre otros, causando chancros y necrosis en el tronco y/o brazos, así como, la desecación y muerte de la zona afectada (Gramaje *et al.*, 2018).

Los objetivos de esta investigación fueron: i) aislar microorganismos endófitos nativos procedentes de la raíz y rizósfera de la vid y ii) evaluar *in vitro* su potencial como agentes de biocontrol contra *L. theobromae*, *C. pseudofasciculare* y *P. parasiticum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó durante el 2015-2016 en el laboratorio “Agrexlabs” de la empresa “Vivero-Los viñedos”-Chincha y en el laboratorio de Fitopatología (Departamento de Sanidad Vegetal)-Facultad de Agronomía-Universidad Nacional de Piura-Piura.

### Selección y recolección de muestras

Se recolectaron muestras de 300 g de suelo de la rizósfera y raíces entre los 20-30 cm de profundidad en diferentes zonas productoras de vid en Piura (Tabla 1), muestreando plantas más vigorosas, abundante sistema radicular, con los mejores registros de productividad. Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel kraf, etiquetas y almacenadas a 12°C hasta su análisis en laboratorio.

**Tabla 1. Aislamientos de antagonista fungosos y bacterianos de la raíz y rizósfera de diferentes Valles de Piura.**

Aislado	Valle	Variedad/patrón	Zona
Tr-7	San Lorenzo	Red Globe/MGT 101-14	Rizósfera
Tr-4	San Lorenzo	Red Globe/Harmony	Rizósfera
Tr-5	Cieneguillo	Red Globe/MGT 101-14	Rizósfera
Tr-1	Cieneguillo	Red Globe/MGT 101-14	Raíz
Tr-3	Medio Piura	Red Globe/MGT 101-14	Raíz
Tr-2	Medio Piura	Red Globe/MGT 101-14	Raíz
Tr-6	Cieneguillo	Red Globe/Harmony	Raíz
Act-1	Alto Piura	Red Globe/Harmony	Rizósfera
Act-2	Cieneguillo	Red Globe/MGT 101-14	Rizósfera
Bac-1	Alto Piura	Red Globe/MGT 101-14	Rizósfera
Bac-2	Medio Piura	Red Globe/MGT 101-14	Rizósfera
Bac-3	Cieneguillo	Red Globe/MGT 101-14	Rizósfera
Bac-4	Cieneguillo	Red Globe/MGT 101-14	Raíz
Bac-5	Medio Piura	Red Globe/MGT 101-14	Raíz
Bac-6	San Lorenzo	Red Globe/Harmony	Raíz

### Aislamiento de microorganismos antagonistas de la rizósfera

Se pesó 1 g de muestra de suelo (rizósfera) y se colocó en tubos de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, con ayuda de un agitador magnético vortex-genie se homogenizó la muestra. Se hicieron diluciones seriadas  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  (hongos) y  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  (bacterias) extrayendo una alícuota de 0.1 ml colocándolo en una placa de Petri con medio PDA (papa dextrosa agar) con 50 mg tetraciclina (antibiótico) para hongos y sin tetraciclina para bacterias, se incubó durante 3 días (bacterias) y 5 días (hongos) a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , se usó la metodología de Delgado y Javier (1991) con modificaciones en el antibiótico y el tiempo de incubación de los microorganismos.

### Aislamiento de microorganismos endófitos de la raíz

Se cortaron segmentos de raíces (0.2x0.8 cm), sumergiéndose en alcohol (70%) durante 5 segundos, posteriormente fueron colocadas en papel toalla estéril para su secado; con ayuda de una pinza y un bisturí, se colocó 10 segmentos (0.2x0.2 cm) por placa con PDA (3 repeticiones por muestra). Se incubó durante 3 días (bacterias) y 5 días (hongos) a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , realizándose la selección y purificación de los aislados en medio PDA. Se usó la metodología de Delgado y Javier (1991) con modificaciones para este estudio (tiempo de inmersión de las raíces en alcohol 70% durante 5 segundos).

### Identificación de hongos y bacterias

En hongos, se observaron las características morfológicas de las colonias: color anverso y reverso, tasa de crecimiento, textura, color, y topografía en medio PDA, y características microscópicas: conidios,

conidióforos e hifas (Barnett y Hunter, 1972; Romero-Cortes *et al.*, 2019). En bacterias, se identificaron mediante observaciones morfológicas de la colonia y microscópica comparadas con lo descrito por Bergey *et al.* (2000).

### Prueba *in vitro* de aislados nativos frente a hongos de la madera de la vid

En hongos, se utilizaron los aislados nativos con ocho días de incubación, y fueron comparados con tres aislados comerciales; *T. harzianum* (T-22 y Trnai) y *T. atroviride* (T.atv), para evaluar su control en cultivos duales contra *L. theobromae* (10 días de incubación), *C. pseudofasciculare* y *P. parasiticum* (20 días de incubación) procedentes de la micoteca del laboratorio Agrex Labs.

Se estudiaron los mecanismos de antagonismo: competencia por sustrato y antibiosis (Calvo *et al.*, 2012). En la competencia por sustrato se estudiaron dos variables: I) Ubicación en la escala de clases de Bell *et al.* (1982); clase 1, el antagonista cubre completamente al patógeno; clase 2, el antagonista sobrepasa las  $\frac{2}{3}$  partes del medio de cultivo; clase 3, el antagonista y patógeno, cada uno ocupa la mitad del medio de cultivo; clase 4, el patógeno coloniza las  $\frac{3}{4}$  partes de la caja Petri; clase 5, el patógeno cubre completamente al antagonista. II) Tiempo de contacto antagonista-patógeno (días) (Calvo *et al.*, 2012). La antibiosis se midió mediante el “Porcentaje de inhibición del crecimiento” (PIC). Se calculó el PIC bajo la fórmula de Ezziyyani *et al.* (2004) donde  $\text{PIC} = [(C1 - C2) / C1] * 100$ , donde C1 se refiere al “crecimiento radial del testigo” (patógeno sin antagonista) y C2 el “crecimiento radial del patógeno” en los tratamientos, realizando 3 repeticiones por tratamiento.

En bacterias, se utilizaron los aislados bacterianos y un aislado comercial (*Bcnai-B. subtilis*). Se realizó cultivos duales frente a *L. theobromae*, *C. pseudofasciculare* y *P. parasiticum*, y se calculó PIC propuesto por Ezziyyani *et al.* (2004) con modificaciones para este estudio en el enfrentamiento dual; aislado fúngico-patógeno (3 cm) y aislado bacteriano-patógeno (2 cm).

### Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  y comparación de medias mediante la prueba de diferencias de media significativa (LSD) de Fisher. Se usó el paquete estadístico Stagraphics versión 19.

## RESULTADOS

### Aislamiento de hongos y bacterias antagonista

De la raíz, se aislaron cuatro antagonistas fungosos (Tr-1, Tr-2, Tr-3, Tr-6) y tres bacterianos (Bac-4, Bac-5, Bac-6). De la rizósfera, se aislaron tres antagonistas fungosos (Tr-4, Tr-5, Tr-7) y cinco bacterianos (Act-1, Act-2, Bac-1, Bac-2, Bac-3). (Tabla 1).

### Identificación de hongos antagonistas

Se identificó mediante características típicas el género *Trichoderma* spp. en medio PDA, las colonias fúngicas presentaron una variación de color verde claro, oscuro y brillante, variación de la textura de algodonosa y granular. A nivel microscópico las hifas septadas, anchas, rectas, angostas (relativamente). Los conidióforos son hialinos, verticales, no verticilados, eje principal ramificado (forma irregular y piramidal). Las esporas asexuales o conidias son hialina a verdes, unicelulares, ovoides y/o elipsoidales, acumuladas en

cabezuelas aparentemente húmedas, y pulverulentas con diámetro de 3-6µm (Tabla 2). El aislado Tr-7 presentó la mayor tasa de crecimiento con  $20.1 \pm 0.2$  mm/día (Tabla 3).

### Identificación de bacterias antagonistas

Se identificó en AN, el género *Bacillus* spp., con un color de la colonia crema, consistencia varía desde cremosa a seca, forma irregular, bordes aserrados, superficie opaca y elevación plana. Bacilos Gram positivos formadores de endosporas en el centro, células bacterianas móviles y crecimiento a 50°C.

Así también, se identificó el género *Streptomyces* sp. por el color de la colonia beige, consistencia seca pulverulenta, forma irregular, borde ondulado, superficie rugosa, bacilos filamentosos y Gram positivos, formación de endosporas, y no móviles.

### Prueba *in vitro* por Hongos

En la prueba de cultivos duales evaluados con la escala de Bell *et al.* (1982), los aislados Tr-1, Tr-7, T.atv y T-22 se ubican en la clase 1 frente a *L. theobromae* cubriendo por completo la colonia a los 4 días después de la siembra siendo estadísticamente similares, los demás aislados se ubicaron en la clase 2. En las pruebas duales frente a *C. pseudofasciculare* y *P. parasiticum* los aislados antagonistas se ubicaron en la clase 1 siendo estadísticamente similares entre sí, 4 días después de la siembra (Tabla 3).

En el tiempo de contacto, los antagonistas entraron en contacto con *L. theobromae* a los 2 días después de la siembra no presentando diferencias significativas. Sin embargo, frente a *C. pseudofasciculare* y *P. parasiticum* entraron en contacto a los 3 días después de la siembra (Tabla 3).

**Tabla 2. Características morfológicas de los aislados antagonistas fungosos.**

Aislado	Color	Topografía	Margen	Textura	Hifa	Conidióforo	Conidia
Tr-1	Verde brillante	Aplanada	Entero	Granular	Septada	Hialino, ramificado, no verticilado	Hialina, unicelular, ovoide
Tr-2	Verde oscuro	Aplanada	Entero	Granular	Septada	Hialino, ramificado, no verticilado	Hialina, unicelular, ovoide
Tr-3	Verde brillante	Aplanada	Entero	Granular	Septada	Hialino, ramificado, no verticilado	Hialina, unicelular, ovoide
Tr-4	Verde oscuro	Aplanada	Entero	Algodonosa y granulada	Septada	Hialino, ramificado, no verticilado	Hialina, unicelular, ovoide
Tr-5	Verde oscuro	Aplanada	Entero	Algodonosa y granulada	Septada	Hialino, ramificado, no verticilado	Hialina, unicelular, ovoide
Tr-6	Verde claro	Aplanada	Entero	Granular	Septada	Hialino, ramificado, no verticilado	Hialina, unicelular, ovoide
Tr-7	Verde claro	Aplanada	Entero	Granular	Septada	Hialino, ramificado, no verticilado	Hialina, unicelular, ovoide

**Tabla 3. Escala de Bell y tiempo de contacto (T.C) de *Trichoderma* spp. frente a los hongos de la madera de la vid.**

Aislado	T.cr <sup>1</sup> (mm/día)	<i>L. theobromae</i>		<i>C. pseudofasciculare</i>		<i>P. parasiticum</i>	
		E.B <sup>5</sup>	T.C	E.B <sup>5</sup>	T.C	E.B <sup>5</sup>	T.C
Trnai <sup>2</sup>	13.4±0.1 c	2.0 b	2.0 a	1.0 a	3.0 a	1.0 a	3.0 a
Tr-4	13.4±0.1 c	2.0 b	2.0 a	1.0 a	3.0 a	1.0 a	3.0 a
Tr-6	13.7±0.2 b	2.0 b	2.0 a	1.0 a	3.0 a	1.0 a	3.0 a
Tr-7	20.1±0.2 a	1.0 a	2.0 a	1.0 a	3.0 a	1.0 a	3.0 a
Tr-3	13.4±0.1 c	2.0 b	2.0 a	1.0 a	3.0 a	1.0 a	3.0 a
Tr-2	13.4±0.1 c	2.0 b	2.0 a	1.0 a	3.0 a	1.0 a	3.0 a
Tr-5	13.5±0.2 bc	2.0 b	2.0 a	1.0 a	3.0 a	1.0 a	3.0 a
T-22 <sup>3</sup>	13.5±0.3 bc	1.0 a	2.0 a	1.0 a	3.0 a	1.0 a	3.0 a
T.atv <sup>4</sup>	13.6±0.1 c	1.0 a	2.0 a	1.0 a	3.0 a	1.0 a	3.0 a
Tr-1	13.3±0.1 c	1.0 a	2.0 a	1.0 a	3.0 a	1.0 a	3.0 a

<sup>1</sup>Tasa de crecimiento, <sup>2,3</sup>*T. harzianum*, <sup>4</sup>*T. atroviride* (T.atv), <sup>5</sup>Escala de Bell *et al.* (1982)

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticas.

### Porcentaje de Inhibición de crecimiento - PIC por hongos

Los aislados T.atv (59.4%), Tr-3 (57.7%) y Tr-5 (54.4%) alcanzaron el mayor PIC frente *L. theobromae* siendo estadísticamente similares entre sí y superiores a los demás aislados. Los aislados Tr-1, Tr-2, Tr-5, Tr-6, Tr-7, Trnai y T.atv presentaron mayor PIC siendo superior a 75.6% frente *C. pseudofasciculare*. Los aislados Tr-5, Tr-7 y T-22 presentaron PIC mayor a 71.4% frente a *P. parasiticum* (Tabla 4) (Figura 1).

**Tabla 4. Porcentaje de Inhibición de crecimiento (PIC) de los aislados fúngicos.**

Aislado	<i>L. theobromae</i>	<i>C. pseudofasciculare</i>	<i>P. parasiticum</i>
Tr-2	37.8 d	82.1 ab	71.4 c
Tr-6	40.3 cd	82.1 ab	71.4 c
T-22 <sup>1</sup>	42.0 cd	79.5 bc	85.7 a
Tr-1	42.0 cd	82.1 ab	76.2 b
Trnai <sup>2</sup>	42.0 cd	80.7 ab	71.4 c
Tr-7	46.1 c	83.3 ab	85.7 a
Tr-4	47.8 bc	75.6 c	71.4 c
Tr-5	54.4 ab	84.6 a	85.7 a
Tr-3	57.7 a	79.5 bc	71.4 c
T.atv <sup>3</sup>	59.4 a	80.7 ab	71.4 c

<sup>1,2</sup>*T. harzianum* (T-22 y Trnai) y <sup>3</sup>*T. atroviride* (T.atv)

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticas.

### Prueba *in vitro* por Bacterias

Los aislados Act-1 (71%), Bac-3 (71.5%) y Act-2 (72.5%), presentaron el mayor PIC frente a *L. theobromae* siendo estadísticamente similares entre sí. Por otro lado, los aislados Bac-2 (61.4%) y Bac-3 (59.1%) presentaron mayor PIC frente a *C. pseudofasciculare* por encima de 45.5%. El aislado Bac-3 presentó el mayor (PIC), superior a 33.0% frente a *P. parasiticum* (Tabla 5) (Figura 1).

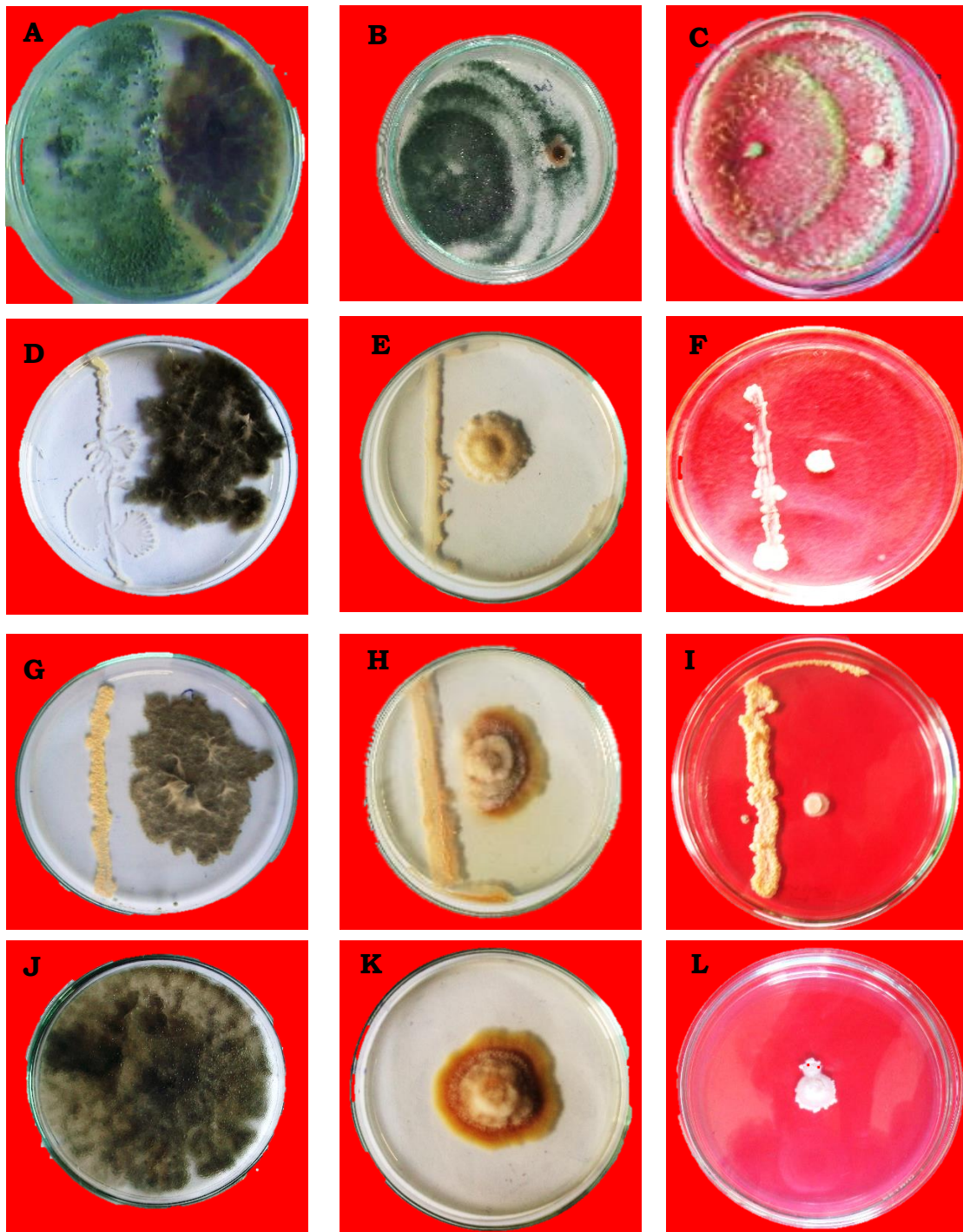
**Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento de aislados bacterianos.**

Aislado	<i>L. theobromae</i>	<i>C. pseudofasciculare</i>	<i>P. parasiticum</i>
Act-1	71.0 a	45.5 b	33.0 d
Act-2	72.5 a	51.5 b	40.4 c
Bac-1	66.5 bc	53.8 ab	47.7 b
Bac-2	68.0 b	61.4 a	40.4 c
Bac-3	71.5 a	59.1 a	62.4 a
Bac-4	63.5 de	52.3 ab	43.1 bc
Bac-5	61.5 e	46.2 b	33.0 d
Bac-6	65.5 cd	56.8 ab	42.2 bc
Bcnai*	55.5 f	51.5 b	44.0 bc

\*Aislado comercial: *B. subtilis* (Bcnai); \*Letras diferentes indican diferencias estadísticas.

## DISCUSIÓN

Perú se convertido en el primer exportador de uva de mesa (MINCETUR, 2022). Así también, en Perú se ha reportado *P. parasiticum* afectando el crecimiento y desarrollo de vides jóvenes (4-8 meses) (Romero-Rivas *et al.*, 2009). El incremento de áreas cultivadas y prácticas de manejo agronómico con el fin de aumentar la producción, han originado un incremento importante de las EMV (Gramaje *et al.*, 2018; Dries *et al.*, 2021). Las estrategias en el manejo EMV están basadas en el reducido número de moléculas activas y en las prácticas culturales del cultivo (Battiston *et al.*, 2021; Dries *et al.*, 2021), lo que ha incrementado la incidencia EMV en campo y vivero (Silva-Valderrama *et al.*, 2021). Las restricciones de materias activas en mercados externos, ha hecho necesario incrementar el número alternativas para ser frente a los patógenos de las EMV, por esta razón, el control biológico puede ser incorporado en una viticultura sostenible (Dries *et al.*, 2021).



**Figura 1.** Prueba *in vitro* de aislados nativos frente “hongos de la madera de la vid”. *Trichoderma* frente A) *L. theobromae*, B) *C. pseudofasciculare*, C) *P. parasiticum*; *Bacillus* frente D) *L. theobromae*, E) *C. pseudofasciculare*, F) *P. parasiticum*; *Streptomyces* sp. frente G) *L. theobromae*, H) *C. pseudofasciculare*, I) *P. parasiticum*.; colonia de patógenos J) *L. theobromae*, K) *C. pseudofasciculare*, L) *P. parasiticum*.

Los aislados Tr-1, Tr2, Tr-3, Tr-4, Tr-5, Tr-6, Tr-7 fueron identificados como *Trichoderma* spp. mediante observaciones morfológicas y microscópicas coincidiendo con las claves descritas por Barnett y Hunter (1972) y Romero-Cortes *et al.* (2019).

Asimismo, se identificaron seis aislados del género *Bacillus* spp. y dos *Streptomyces* sp., estas descripciones corresponden a las mencionadas por Bergey *et al.* (2000). Los 10 aislados fúngicos (7 cepas nativas y 3 cepas comerciales) en la escala de Bell *et*

al. (1982) frente a *C. pseudofasciculare* y *Phaeoacremonium parasiticum*, se ubicaron en la clase 1, asimismo, Tr-1, T.atv y T-22 frente a *L. theobromae* se ubicaron en la clase 1. Resultados similares fueron obtenidos por Garrido y Vilela (2019) con *Trichoderma harzianum* frente a los fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae-sativae*, *R. oryzae* y *Nakateo sigmoidea* se ubican en la clase 1. Sin embargo, frente a *Sclerotium rolfsii* se ubica en la clase 3. Andrade-Hoyos et al. (2020) ubicaron *T. asperellum* (T-AS6), *T. harzianum* (T-H3) y *T. koningiopsis* (T-K8 y T-K11) en la clase 1 frente a *Phytophthora cinnamomi*, mientras que *T. harzianum* (T-H4 y T-H5), *T. hamatum* (T-A12) y *T. asperellum* (T-AS1) en la clase 2 frente al *P. cinnamomi*. Así también, *T. harzianum* y *T. viride* colonizaron y esporularon sobre colonias de *R. solani* (Aguilar-Ancocota y Mattos-Calderón, 2020).

Todos los aislados entraron en contacto con *L. theobromae* a los 2 d, respecto a *C. pseudofasciculare* y *P. parasiticum*, tuvieron contacto a los 3 d. Guédez et al. (2012) demostraron que *Trichoderma* entra en contacto con *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum* a los dos y tres días de su enfrentamiento, así también, indican que un menor tiempo de contacto, es un indicador de una mayor agresividad.

El PIC en hongos, Tr-5, Tr-3 y T.atv frente a *L. theobromae* fueron superiores con 54.4%, 57.7% y 59.4% respectivamente. Tr-5 frente a *C. pseudofasciculare*, mostro el mayor PIC con 84.6%. Tr-5, Tr-7 y T-22 presentaron PIC superior a 71.4% frente a *Phaeoacremonium parasiticum*. Wanjiku et al. (2021) obtuvieron PIC de 54.57% de *T. harzianum* frente a *L. theobromae*. Así también, Bhadra et al. (2014) mencionan que aislados de *Trichoderma* spp. tienen PIC entre el 60 a 75% a 28±2°C confrontados con *L. theobromae*. Diferentes aislados de *Trichoderma* spp. presentan diferentes PIC frente a *L. theobromae* y *C. pseudofasciculare*, debido a sus distintos mecanismos de control (Hernández et al., 2016). El PIC en bacterias, Act-1, Bac-3 y Act-2 frente a *L. theobromae* presentaron los mayores valores con 71%, 71.5% y 72.5% respectivamente. Bac-2 (61.4%) y Bac-3 (59.1%) frente a *C. pseudofasciculare* presentaron el mayor PIC. Tr-5, Tr-7 y T-22 presentaron el mayor PIC con 85.7% frente a *P. parasiticum*. Borges et al. (2018) indican que *Bacillus* spp. (UnB1366) inhibió significativamente el crecimiento de *L. theobromae* en un 45.5%. Jiménez et al. (2018) demostraron que *B. subtilis* y *B. licheniformis* inhibieron el crecimiento de *Venturia inaequalis* en un 33% y 41.3% respectivamente. Los actinomicetos (*Streptomyces* spp) presentan altos niveles de inhibición: cepa APC70 contra *Alternaria* spp. (57.6%), cepa AAH53 contra *Rhizoctonia* spp. (53.08%), y cepa AAH53 contra *Fusarium* spp. (49.36%) (Dávila et al., 2013).

## Microorganismos biocontroladores como alternativa de manejo de EMV

El manejo de una viticultura sostenible empieza a tomar mayor importancia, y en especial por la salud del suelo y su interacción planta-microorganismos en la rizósfera (Dries et al., 2021), mejorando su calidad, fertilidad y la supresión de patógenos influyendo directa o indirectamente en la productividad de los cultivos (Karimi et al., 2020; Aguilar-Ancocota et al., 2021; Dries et al., 2021).

*Trichoderma* ha demostrado un control directo de los patógenos de la madera de la vid, así también, es un promotor de crecimiento y activador de los genes de resistencia de las plantas (Stempien et al., 2020). Además, *Trichoderma* T154 tiene un comportamiento endófito colonizando haces vasculares y reduciendo la colonización *Phaeoacremonium minimum* (Carro-Huerga et al., 2020). Las pruebas *in vitro* han demostrado controlar patógenos como; *Phomopsis viticola*, *Pa. chlamydospora*, *Eutypa lata*, anamorfos de *Botryosphaeria* (Kotze et al., 2011), en vivero en la etapa de injertación ha controlado a los patógenos; *P. minimum* y *Pa. chlamydospora*. En campo, Mutawila et al. (2016) mencionan que el periodo óptimo para inocular *Trichoderma* es de 6 horas posterior a la poda, obteniendo buenos resultados en la colonización de haces vasculares. Carro-Huerga et al. (2020) comentaron que cepas nativas de *Streptomyces* (Actinomicetos) reducen los síntomas de las EMV en vid jóvenes causado por *Dactylonectria* sp., *P. minimum* y *Pa. chlamydospora*. *Paraburkholderia phytofirmans* (PsJN) (bacteria endófito) coloniza haces vasculares de un amplio rango de plantas, promueve el crecimiento e induce la resistencia de plantas frente a los estreses biótico y abiótico (Esmaeel et al., 2018). Asimismo, la aplicación en conjunto de fenpiclonil (fungicida) y PsJN sobre los tejidos vasculares de vid, ha inducido la resistencia de la planta frente a *Neofusicoccum parvum*, patógeno relacionado con la muerte regresiva de *Botryosphaeria* (Wu et al., 2020).

## CONCLUSIONES

Los aislados nativos Bac-3 (*Bacillus* spp.), Tr-5 (*Trichoderma* spp.), Act-2 (*Streptomyces* sp.) demostraron control *in vitro* frente a los patógenos *Lasiodiplodia theobromae*, *Campylocarpon pseudofasciculare* y *Phaeoacremonium parasiticum* obteniendo resultados similares y/o superiores a aislados comerciales *Trichoderma harzianum* (T-22 y Trnai), *Trichoderma atroviride* (T.atv) y *Bacillus subtilis* (Bcnaí). El biocontrol es usado tanto en vivero como campo para el manejo EMV, aplicados (suelo, heridas de poda, foliar) solos o combinados con otros biocontroladores, foliares nutricionales y fungicidas.

**Agradecimiento**

Al ing. Juan Munive Olivera, gerente de la empresa “Vivero-Los viñedos”-Chincha, Perú, por su apoyo logístico.

**Funding.** All authors declare not having received any funding in the development of our research.

**Conflict of interest.** All authors declare not having any conflict of interest in this article that has affected the performance of the same.

**Compliance with ethical standards.** Do not apply

**Data availability.** Data is available with the corresponding author upon reasonable request.

**Author contribution statement (CRediT).** **A. Morales-Pizarro** - Formal analysis, Conceptualization, methodology, Writing – review & editing., **J. Javier-Alva** - Conceptualization, Data Curation, Methodology, Editing., **L. Álvarez-Bernaola** - Methodology, Writing – review & editing, editing., **R. Mayta – Obos** - Writing – review & editing., **R. Aguilar-Ancota** - Conceptualization, Data curation., **R. Peña-Castillo** – Validation., **R. Chanduvi-García** – Methodology., **D. Lindo-Seminario** - Data curation, Supervision.

**REFERENCIAS**

- Aguilar-Ancota, R. and Mattos-Calderón, L., 2020. Etiology and control of *Gypsophila paniculata* L. stem base rot in the Caraz Valley, Ancash. *Peruvian Journal of Agronomy*, 4(1), pp. 17-26. <https://doi.org/10.21704/pja.v4i1.1461>.
- Aguilar-Ancota, R., Arévalo-Quinde, C. G., Morales-Pizarro, A., and Galecio-Julca, M., 2021. Hongos asociados a la necrosis de haces vasculares en el cultivo de banano orgánico: síntomas, aislamiento e identificación, y alternativas de manejo integrado. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), pp. 249-256. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.028>.
- Agencia Agraria de Noticias (Agraria), 2021. Estados Unidos y Países Bajos concentran el 47% de las agroexportaciones peruanas en el primer semestre del 2021. <https://agraria.pe/noticias/estados-unidos-y-paises-bajos-concentran-el-47-de-las-agroex-25139>.
- Armengol, J. and Gramaje, D., 2019. Adaptación del material vegetal y efectos sobre las enfermedades de la madera. *Cajamar Caja Rural*, 12, pp. 245-263. <https://publicacionescajamar.es/publicacione>
- scajamar/public/pdf/series-tematicas/informes-coyuntura-monografias/el-sector-vitivinicola-frente-al.pdf.
- Andrade-Hoyos, P., Silva-Rojas, H. V. and Romero-Arenas, O., 2020. Endophytic *Trichoderma* Species Isolated from *Persea americana* and *Cinnamomum verum* Roots Reduce Symptoms Caused by *Phytophthora cinnamomi* in Avocado. *Plants*, 9(9), pp. 1220. <https://doi.org/10.3390/plants9091220>.
- Bach, E., dos Santos Seger, G. D., de Carvalho Fernandes, G., Lisboa, B. B. and Passaglia, L. M. P., 2016. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology*, 99, pp. 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.002>.
- Battiston, E., Compant, S., Antonielli, L., Mondello, V., Clément, C., Simoni, A. and Fontaine, F., 2021. In planta Activity of Novel Copper (II)-Based Formulations to Inhibit the Escalated Associated Fungus *Phaeoacremonium minimum* in Grapevine Propagation Material. *Frontiers in Plant Science*, 12, pp. 312. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.649694>.
- Barnett, H. and Hunter, B., 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, USA.
- Bell, D. K., Wells, H. D. and Markham, C. R., 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), pp. 379-382. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Abstracts/Phyto72\\_379.htm](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Abstracts/Phyto72_379.htm)
- Bergey, J., Hendrix, D. and Holt, J., 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition, Edited by Williams Wikins Baltimore Maryland, USA.
- Bhadra, M., Khair, A., Hossain, M. A. and Sikder, M. M., 2014. Efficacy of *Trichoderma* spp. and fungicides against *Lasioidiplodia theobromae*. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 49(2), pp. 125-130. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v49i2.22008>.
- Borges, R. C. F., Marques, E., Macedo, M. A., Martins, I., Silva, J. G. D. and Mello, S. C. M. D., 2018. Biocontrol of teak canker caused by *Lasioidiplodia theobromae*. *Revista Árvore*, 42(3). <https://doi.org/10.1590/1806-90882018000300004>.
- Calvo, J. A., Rivera-Coto, G., Orozco-Cayasso, S. and Orozco-Rodríguez, R., 2012. Aislamiento y



- evaluación in vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), pp. 225-231. [https:// DOI 10.15517/AM.V23I2.6481](https://doi.org/10.15517/AM.V23I2.6481).
- Carro-Huerga, G., Compant, S., Gorfer, M., Cardoza, R. E., Schmoll, M., Gutiérrez, S. and Casquero, P. A., 2020. Colonization of *Vitis vinifera* L. by the endophyte *Trichoderma* sp. strain T154: Biocontrol activity against *Phaeoacremonium minimum*. *Frontiers in Plant Science*, 11, pp. 1170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01170>.
- Claverie, M., Notaro, M., Fontaine, F. and Wery, J., 2020. Current knowledge on Grapevine Trunk Diseases with complex etiology: a systemic approach. *Phytopathology Mediterraena*, 59, pp. 29–53. [https:// doi: 10.14601/Phyto-11150](https://doi.org/10.14601/Phyto-11150).
- Dávila Medina, M. D., Gallegos Morales, G., Hernández Castillo, F. D., Ochoa Fuente, Y. M. and Flores Olivares, A., 2013. Actinomicetos antagonísticos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(8), pp. 1187-1196. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4n8/v4n8a6.pdf>.
- Delgado, M., and Javier, J., 1991. Ensayos en el control biológico de *Macrophomina phaseolina* (tassi) Goid., agente causal de la pudrición carbonosa de la raíz del algodónero en Piura. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PE19950135703>
- Dries, L., Hendgen, M., Schnell, S., Löhnertz, O. and Vorkamp, A., 2021. Rhizosphere engineering: leading towards a sustainable viticulture? *OENO One*, 55(2), pp. 353-363. <https://doi.org/10.20870/oenone.2021.55.2.4534>.
- Esmaeel, Q., Miotto, L., Rondeau, M., Leclère, V., Clément, C., Jacquard, C., Sanchez, L. and Barka, E. A., 2018. *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN-plants interaction: from perception to the induced mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 2093. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02093>.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., and Castillo, M. E. C., 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. In *Anales de Biología*, 26, pp. 61-68. <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/30471>.
- FAO (Food and Agriculture Organization)., 2019. FAOSTAT, Crops and livestock products. [https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/vi\\_sualize](https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/vi_sualize).
- Garrido Rondoy, M. and Vilela Severino, N., 2019. Antagonistic capacity of *Trichoderma harzianum* compared to *Rhizotecnia*, *Nakataea sigmoidea*, *Sclerotium rolfsii* and its effect in native strains of *Trichoderma* isolated from rice crops. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), pp. 199-206. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.05>.
- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J. R. and Sosnowski, M. R., 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Disease*, 102(1), pp. 12-39. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0512-FE>.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C. and Olivar, R., 2012. Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(1), pp. 44-49. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199424929012>.
- Hernández, E. O., Castillo, F. D. H., Herrera, R. R., Fuentes, S. E. V., Drouaillet, B. E. and Santillán, J. A. L., 2016. Actividad antagonística de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* in vitro. *Investigación y Ciencia*, 67, pp. 5-11. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6137740>.
- Jiménez, M. D. C. M., Hernández, F. D., Alcalá, E. I. L., Morales, G. G., Valdés, R. A. and Reyes, F. C., 2018. Biological effectiveness of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. on apple scab (*Venturia inaequalis*) in vitro and under field conditions. *European Journal of Physical and Agricultural Sciences*, 6(2), pp. 7-17. [https://www.researchgate.net/publication/339313696\\_Biological\\_Efficacy\\_of\\_Trichoderma\\_spp\\_and\\_Bacillus\\_spp\\_in\\_the\\_Management\\_of\\_Plant\\_Diseases](https://www.researchgate.net/publication/339313696_Biological_Efficacy_of_Trichoderma_spp_and_Bacillus_spp_in_the_Management_of_Plant_Diseases).
- Karimi, B., Cahurel, J. Y., Gontier, L., Charlier, L., Chovelon, M., Mahé, H. and Ranjard, L., 2020. A meta-analysis of the ecotoxicological impact of viticultural practices on soil biodiversity. *Environmental Chemistry Letters*, 18(6), pp. 1947-1966. [https://www.researchgate.net/publication/342850310\\_A\\_meta-analysis\\_of\\_the\\_ecotoxicological\\_impact\\_of\\_viticultural\\_practices\\_on\\_soil\\_biodiversity](https://www.researchgate.net/publication/342850310_A_meta-analysis_of_the_ecotoxicological_impact_of_viticultural_practices_on_soil_biodiversity).

- Kotze, C., Van Niekerk, J., Mostert, L., Halleen, F. and Fourie, P., 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, pp. S247-S263. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-8960](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8960).
- Langenhoven, S., Halleen, F., Spies, C., Stempien, E. and Mostert, L., 2018. Detection and quantification of black foot and crown and root rot pathogens in grapevine nursery soils in the Western Cape of South Africa. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(3), pp. 519-537. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-23921](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-23921).
- Loc, N. H., Huy, N. D., Quang, H. T., Lan, T. T. and Thu Ha, T. T., 2020. Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. *Mycology*, 11(1), pp. 38-48. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1703839>.
- MINCETUR (Ministerio de Comercio Exterior y Turismo), 2022. Perú se convierte en primer exportador mundial de uvas. <https://www.gob.pe/institucion/mincetur/noticias/585846-peru-se-convierte-en-primer-exportador-mundial-de-uvas>.
- Mutawila, C., Halleen, F. and Mostert, L., 2016. Optimisation of time of application of *Trichoderma* biocontrol agents for protection of grapevine pruning wounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(2), pp. 279-287. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12218>.
- Romero-Cortes, T., López-Pérez, P. A., Pérez España, V. H., Medina-Toledo, A. K., Aparicio-Burgos, J. E., and Cuervo-Parra, J. A., 2019. Confrontación de *Trichoderma asperellum* vsl80 contra *Aspergillus niger* a través del efecto de la producción enzimática. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), pp. 68-80. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000202>
- Romero-Rivas, L. C., Álvarez, L. A., Gramaje, D., Armengol, J. and Cadenas-Giraldo, C., 2009. First report of *Phaeoacremonium parasiticum* causing Petri disease of grapevine in Peru. *Plant Disease*, 93(2), pp. 200-200. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-2-0200B>.
- Silva-Valderrama, I., Toapanta, D., Miccono, M. D. L. A., Lolas, M., Díaz, G. A., Cantu, D. and Castro, A., 2021. Biocontrol potential of grapevine endophytic and rhizospheric fungi against trunk pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11, pp. 3311. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.614620>.
- Stempien, E., Jean, R., Pierron, G., Adendorff, I., Van Jaarsveld, W. J., Halleen, F. and Mostert, L., 2020. Host defence activation and root colonization of grapevine rootstocks by the biological control fungus *Trichoderma atroviride*. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(3), pp. 615-626. <https://doi.org/10.14601/Phyto-11137>.
- Wanjiku, E. K., Waceke, J. W. and Mbaka, J. N., 2021. Suppression of Stem-End Rot on Avocado Fruit Using *Trichoderma* spp. in the Central Highlands of Kenya. *Advances in Agriculture*, 2021(2021). <https://doi.org/10.1155/2021/8867858>.
- Wu, H., Spagnolo, A., Marivingt-Mounir, C., Clément, C., Fontaine, F. and Chollet, J. F., 2020. Evaluating the combined effect of a systemic phenylpyrrole fungicide and the plant growth-promoting rhizobacteria *Paraburkholderia phytofirmans* (strain PsJN: gfp2x) against the grapevine trunk pathogen *Neofusicoccum parvum*. *Pest Management Science*, 76(11), 3838-3848. <https://doi.org/10.1002/ps.5935>.