

Observación al microscopio electrónico de la cepa *Streptomyces* sp. VV/E1 en el xilema de sistema radicular de una planta de vid tras su introducción por inmersión del sistema radicular en una suspensión bacteriana.

José Manuel Álvarez-Pérez^{a,*},
Sandra González-García^{a,*},
Rebeca Cobos^a,
Ana M. Ibáñez^a,
Alba Díez-Galán^a,
Carla Calvo-Peña^a y
Juan José R. Coque^{a,b,*}

^a Instituto de Investigación de la Viña y el Vino, Universidad de León, León, España

^b Departamento de Biología Molecular. Área de Microbiología. Universidad de León, León, España

*jrrubc@unileon.es

* Los dos autores han contribuido igualmente a este trabajo.

Actinobacterias rizosféricas y endofíticas para la protección frente a hongos causantes de enfermedades de madera de vid que penetran a través del aparato radicular

Numerosas cepas de actinobacterias aisladas del entorno radicular de plantas jóvenes de vid procedente de Viveros Villanueva Vides S.L. (Larraza, Navarra) han mostrado una alta capacidad antifúngica *in vitro* frente a varios hongos patógenos implicados en pie negro y enfermedad de Petri, patologías ambas asociadas al decaimiento de viñedos jóvenes. Una selección de seis cepas del género *Streptomyces*, al ser aplicadas en campo sobre injertos de vid, fueron capaces de disminuir de manera significativa la infección de plantas de vid por hongos de madera que penetran a través del aparato radicular. Además, dos de ellas disminuían significativamente el nivel de mortalidad de los injertos. Se ha desarrollado un método eficaz de introducción de estas cepas en el interior de plantas de vid por inmersión del sistema radicular en una suspensión bacteriana. Las plantas así inoculadas, cuando se establecen en viñedos de nueva plantación, muestran un alto nivel de protección frente a hongos causantes de las patologías antes indicadas.

Palabras clave: decaimiento de viñedos jóvenes; pie negro; enfermedad de Petri; BCAs; *Streptomyces*.

Las enfermedades de madera de vid son una de las mayores amenazas para el sector vitivinícola a nivel mundial, causando anualmente significativas pérdidas económicas (Gubler y col., 2005). Desafortunadamente, a pesar de los numerosos esfuerzos realizados para intentar atajar este problema, su incidencia en los últimos años ha ido en aumento. Ello es debido a varios factores como: 1.- Por un lado, el término enfermedades de madera de vid engloba un amplio conjunto de patologías como eutipiosis, yesca, enfermedad de Petri, síndrome del brazo negro muerto o pie negro, por citar sólo las más representativas; 2.- El número de especies de hongos implicados en estas patologías es superior a 130, y cada año se descubre alguno nuevo (Úrbez-Torres y col., 2015; Gramaje y col., 2018); 3.- La etiología de estas patologías es complicada; por ejemplo, aunque la enfermedad de Petri es primariamente causada por *Phaeomoniella chlamydospora* y *Togninia minima*, hasta 26 especies de los géneros *Togninia* y *Phaeoacremonium*, y al menos dos especies del género *Cadophora*, se han aislado de plantas afectadas (Úrbez-Torres y col., 2015). El problema se complica todavía más porque con frecuencia dos patologías, como la enfermedad de Petri y el pie negro confluyen para causar un síndrome más complejo como el decaimiento de viñedos jóvenes (Gramaje y Armengol, 2011); 4.- Los métodos de control desarrollados puedan ser efectivos frente a algunos patógenos, pero de baja o nula efectividad frente a otros, por lo que parece evidente que encontrar un tratamiento milagroso que combata efectivamente todos los patógenos es algo puramente utópico. 5.- La actual política tendente en Europa a restringir el uso de fungicidas de síntesis química, por su nocividad para otros seres vivos y el medio ambiente, limita que las grandes casas comerciales pongan todo su énfasis en desarrollar nuevos principios activos; 6.- Otro aspecto que limita su control es que los ciclos biológicos de los patógenos no son bien conocidos en muchos casos y además, al menos en su fase patológica, se desarrollan y colonizan internamente la planta de vid, donde hacer llegar de manera efectiva cualquier principio activo es muy complicado; 7.- Las rutas de infección que

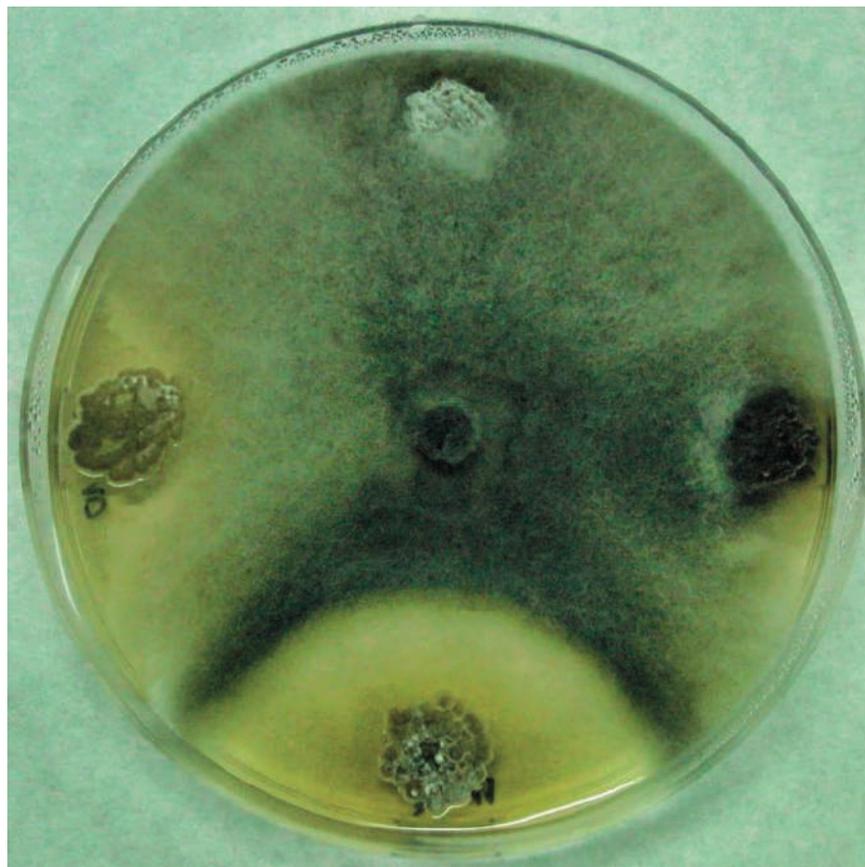


Figura 1. Selección mediante bioensayo de cepas de actinobacterias mostrando actividad antifúngica *in vitro* frente a hongos patógenos causantes de enfermedades de madera de vid. Nótese el halo de inhibición del crecimiento que el aislado en la parte inferior de la placa ejerce sobre el hongo.

usan los patógenos para entrar en la planta son variadas, aunque tradicionalmente se han reconocido dos vías principales: las heridas de poda y otro tipo de lesiones que pueda sufrir la planta, y la penetración a través del sistema radicular; 8.- Por último, la infección se puede producir tanto durante la propagación de plantas de vid en vivero, como una vez la planta se encuentra en el viñedo.

En este contexto tan problemático Viveros Villanueva Vides S.L. (Larraga, Navarra) viene desarrollando diferentes proyectos de investigación con el objetivo de minimizar al máximo la propagación de hongos de madera en las plantas de vid en vivero, especialmente para combatir aquellos que infectan la planta a través del aparato radicular.

En un enfoque novedoso, la empresa se ha planteado la posible utilización de actinobacterias aisladas del propio sistema radicular de plantas de vid para el control de estos hongos.

Las actinobacterias son uno de los grupos bacterianos más complejos

que existen y cuya presencia en suelo es muy amplia, llegando a representar por término medio alrededor del 10% del total de la microbiota bacteriana (Janssen, 2006). Además, son colonizadores endofíticos del sistema radicular de prácticamente cualquier planta, incluyendo la vid (Álvarez-Pérez y col., 2017). No obstante, las actinobacterias en general, y los estreptomicetos en particular (especialmente el género *Streptomyces*), son muy interesantes por su gran capacidad de producción de antibióticos y por su capacidad para controlar muchos patógenos de plantas (Coque y col., 2020).

Resultados y análisis

Aislamiento de actinobacterias rizosféricas y endofíticas del sistema radicular de vid y su actividad antifúngica

El aislamiento realizado a partir del interior de raíces de plantas jóvenes de vid permitió aislar un total de 58 cepas de actinobacterias que en una caracterización inicial correspondie-

ron a los géneros *Streptomyces* (26 aislados), *Micromonospora* (quince aislados), *Saccharopolyspora* (diez aislados), *Nonomuraea* (cuatro aislados) y un único aislado correspondiente a los géneros *Kribbella*, *Rathayibacter* y *Corynebacterium*.

La capacidad antifúngica *in vitro* de cada uno de los aislados frente a los patógenos *Diplodia seriata* y *Dactylonectria macrodidyma* se comprobó mediante la técnica del bioensayo (Figura 1), determinándose que el 15,5% de los aislados eran activos frente al primer patógeno y el 13,8% frente al segundo. La mayoría de los aislados que mostraron actividad antifúngica pertenecían al género *Streptomyces*, y tres de ellos (*Streptomyces* sp. VV/E1, VV/E2 y VV/E5) mostraron también actividad antifúngica *in vitro* frente a los patógenos *P. chlamydospora* y *Phaeoacremonium minimum*, implicados en la enfermedad de Petri, motivo por el que fueron seleccionados para ensayos en campo.

En el caso del aislamiento realizado a partir de la rizosfera (pequeña fracción del suelo en contacto íntimo con la raíz) se aislaron un total de 94 aislados, de los cuales el 30,8% y el 16,0% mostraron actividad antifúngica *in vitro* frente a *D. seriata* y *D. macrodidyma*. Todos los aislados rizosféricos que mostraron actividad frente a los patógenos pertenecían al género *Streptomyces*, y tres aislados (*Streptomyces* sp. VV/R1, VV/R4 y VV/R5) mostraron también actividad frente a *P. chlamydospora* y *Ph. minimum*, por lo que fueron también seleccionados para ensayos en campo.

Este estudio confirma que el sistema radicular de plantas de vid es una fuente potencial de agentes de control biológico (BCAs) frente a hongos causantes de enfermedades de madera de vid. Los posibles BCAs aislados se encontrarían mejor adaptados que otros BCAs aislados de otros ambientes o ecosistemas, lo que les conferiría ventaja a la hora de su posible implantación o colonización del sistema radicular en el momento de la aplicación.

Efecto protector de actinobacterias seleccionadas en ensayos en vivero sobre plantas injertadas

Para que un microorganismo seleccionado como posible BCA frente a una patología sea considerado como tal

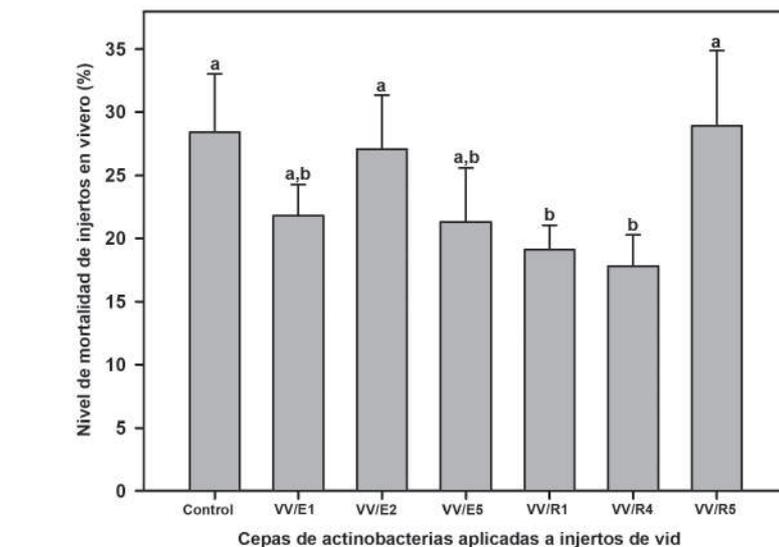


Figura 2. Nivel medio de mortalidad (%) de injertos observado en vivero experimental tras aplicación de diferentes cepas de actinobacterias. Las barras marcadas con la misma letra no difieren de forma significativa ($P \geq 0,05$).

debe cumplir una serie de requisitos. Uno de los más importantes es la demostración de su efectividad en ensayos *in vivo*, o ensayos en campo y, por lo tanto, sobre plantas vivas.

En este sentido, las seis cepas de actinobacterias endofíticas y rizosféricas preseleccionadas se aplicaron de manera individual sobre grupos de 75 injertos (variedad Tempranillo injertada sobre portainjertos Richter 110). Se realizó la inmersión de los injertos en una solución con hormona de enraizamiento que contenía cada actinobacteria a una concentración de 10^7 células/ml. Los injertos se mantuvieron en esta suspensión bacteriana durante 24 horas y seguidamente se llevaron a campo para el establecimiento de un vivero experimental, en uno de los campos que Viveros Villanueva Vides S.L. posee en la localidad de Larraga (Navarra). Los viveros experimentales se establecieron en el mes de mayo durante tres años consecutivos.

El objetivo de este estudio era doble: por un lado, tratar de comprobar la posible eficacia de las actinobacterias en condiciones de campo, y por otro, determinar la existencia, o no, de posibles efectos adversos para la planta.

Tras sesenta días en campo, se midieron una serie de parámetros: porcentaje de mortalidad, altura de la planta y longitud media del séptimo entrenudo. Una vez completado el ciclo de desarrollo de la planta, se procedió a

su arrancado para un análisis más detallado en el mes de diciembre. Básicamente, se trataba de determinar la presencia de hongos de enfermedades de madera en el sistema radicular de la planta.

Los resultados de este estudio fueron los siguientes (Álvarez-Pérez y col., 2017):

- La aplicación de las actinobacterias no tuvo un efecto significativo (ni positivo ni negativo) sobre el desarrollo de las plantas vivas, no detectándose diferencias a nivel de altura total de la planta o longitud del séptimo entrenudo.
- El porcentaje medio de mortalidad de las plantas control (no tratadas) fue del 28,4%. Curiosamente, dos de las actinobacterias aplicadas provocaron un significativo descenso del nivel de mortalidad (Figura 2). En efecto, la cepa *Streptomyces* sp. VV/R1 provocó una disminución de la mortalidad a niveles del 19,1%, mientras que el tratamiento con la cepa *Streptomyces* sp. VV/R4 logró descender el nivel de mortalidad al 17,8%. No se observó efecto alguno del resto de las cepas sobre el nivel de mortalidad.
- Todas las actinobacterias fueron capaces de producir un descenso significativo de los niveles de hongos patógenos implicados en el decaimiento de viñedos jóvenes y que

provocan las patologías Pie negro (grupo *Dactylonectria-Ilyonectria*) o enfermedad de Petri (*P. chlamydospora*). En el caso del patógeno *Ph. minimum*, si bien todas las cepas produjeron un descenso del número de aislados, los resultados no fueron concluyentes, debido a la baja tasa de aislados del patógeno (Figura 3).

Este estudio nos permitió determinar que la aplicación de las cepas de actinobacterias sobre injertos de vid no tenía un efecto negativo sobre el desarrollo de la planta en campo. Además, en el caso concreto de dos cepas (VV/R1 y VV/R4) su aplicación provocó descensos significativos en el nivel de mortalidad. Este hecho es muy significativo ya que la mortalidad de injertos en vivero que no llegan a desarrollar aparato radicular es muy alta (aunque dependiente de la combinación portainjerto-variedad). Esta mortalidad está influenciada por varios factores (Gramaje y Armengol, 2011), incluyendo la posible infección de las incipientes raíces desarrolladas por el injerto por hongos implicados en el decaimiento de viñedos jóvenes, presentes en el suelo del vivero de forma natural. Este resultado, sugiere que efectivamente la infección del injerto por estos hongos contribuye a su muerte. Por último, la aplicación de estas actinobacterias tuvo un claro efecto protector sobre determinados hongos causantes de enfermedades de madera y que infectan a través del aparato radicular, provocando una acusada disminución de sus niveles respecto a los observados en plantas control (no tratadas).

Dados estos resultados tan prometedores Viveros Villanueva Vides S.L. ha solicitado la protección de esta tecnología bajo la figura de una patente española (Álvarez-Pérez y col., 2016) y una Patente Europea concedida pero pendiente de publicación (Álvarez-Pérez y col., 2020).

Desarrollo de un método de inoculación de plantas de vid con actinobacterias seleccionadas

Una vez demostrado el efecto de estas actinobacterias para la protección de injertos de vid, se trataba de comprobar su posible efecto beneficioso sobre plantas jóvenes de vid estableci-

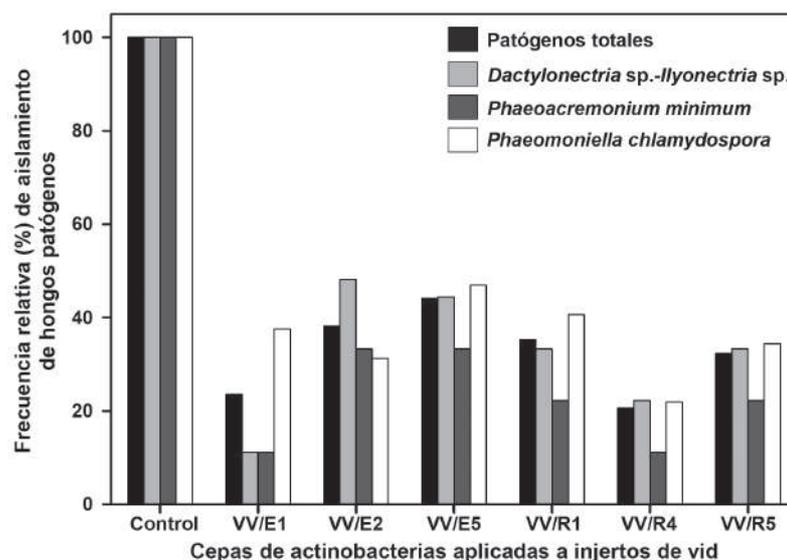


Figura 3. Frecuencia relativa (%) de aislamiento de hongos patógenos a partir del sistema radicular de plantas de vid procedentes de injertos inoculados con diferentes actinobacterias. Un valor arbitrario de 100 fue asignado para cada tipo de patógeno aislado a partir de las plantas control no tratadas.

das en viñedo. Para ello, sin embargo, era necesario desarrollar una metodología que nos permitiera evaluar la posible colonización de las plantas de vid por estas cepas de actinobacterias.

Nos centramos, como modelo de estudio en la cepa endofítica *Streptomyces* sp. VV/E1 y la cepa rizosférica *Streptomyces* sp. VV/R4. El trabajo consistió en desarrollar unos marcadores moleculares específicos (marcadores SCAR) que permiten la amplificación por PCR de una región del genoma (ADN) de estas bacterias con una especificidad del 100%, de manera que su detección es totalmente inequívoca.

El desarrollo de estos marcadores nos permitió además recurrir al empleo de la tecnología de la PCR cuantitativa (qPCR) para determinar de manera exacta el número de bacterias presentes en un determinado tejido de la planta (González-García y col., 2019).

Una vez desarrolladas estas herramientas se procedió a inocular plantas de vid de 1 año suministradas por Viveros Villanueva Vides S.L. con estas dos actinobacterias, utilizando dos metodologías diferentes. Por un lado, la *inyección directa* de las bacterias dentro del aparato radicular (más concretamente en el punto de inserción de raíz) y por otro lado mediante *inmersión del sistema radicular* de las plantas durante 24 horas en una suspensión de las bacterias en medio acuoso. Las plantas así inoculadas, y

un lote de plantas control sin tratar, fueron inmediatamente plantadas en macetas. Posteriormente, a los 30 días tras la plantación se aplicó una dosis de recuerdo de las bacterias directamente al suelo de la maceta en las proximidades de la raíz. Las plantas se cultivaron durante 180 días y seguidamente se arrancaron para su análisis. El objetivo último era determinar la posible colonización de las plantas por las bacterias inoculadas.

El análisis realizado nos permitió aclarar los siguientes aspectos:

- La inoculación de plantas de vid por inmersión del sistema radicular en una suspensión bacteriana es un método efectivo que permitió la colonización tanto del sistema radicular, como del punto de inserción de raíces (Figura 4).
- Por el contrario, la inoculación por inyección permitió la colonización de las zonas cercanas del punto de inoculación (inserción de raíces), incluso detectándose un ligero desplazamiento de la bacteria de unos 2-3 cm a lo largo del portainjertos. Sin embargo, el desplazamiento no permitió la colonización de zonas superiores de la planta ni del sistema radicular (datos no mostrados).
- La inoculación de plantas de vid por inmersión es preferible a la inoculación por inyección por su simplicidad, posibilidad de inocu-

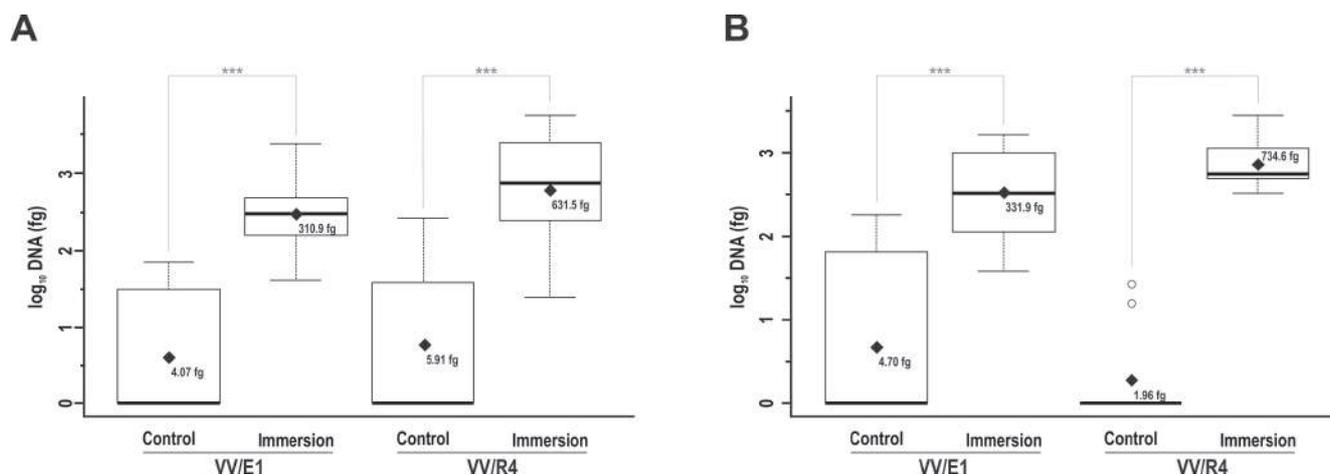


Figura 4. Cuantificación de las actinobacterias *Streptomyces* sp. VV/E1 y *Streptomyces* sp. VV/R4 mediante qPCR en el punto de inserción de raíces (A) y sistema radicular (B) tras su inoculación por inmersión de plantas de vid en una suspensión de la bacteria. Obsérvese, como la cantidad de ADN específico de cada bacteria es muy superior respecto a las plantas control no inoculadas.

lar un número elevado de plantas de manera simultánea y, por tanto, fácil integración en la producción industrial de injertos de vid.

Una vez confirmados estos hechos se realizó un nuevo experimento únicamente con la cepa endofítica *Streptomyces* sp. VV/E1. El experimento, muy similar al anterior, consistió en inocular plantas de 1 año por inmersión, pasarlas a macetas y analizar la presencia de la bacteria inoculada en diferentes tejidos/zonas. En concreto se analizó su presencia en sistema radicular, punto de inserción de raíces, mitad de portainjerto, injerto, segundo peciolo y segunda hoja. Este análisis permitió comprobar que una vez la bacteria logra introducirse a través del sistema radicular puede propagarse a tejidos distantes de la planta, presumiblemente a través del xilema, llegando a alcanzar al menos el segundo peciolo (si bien su presencia en la hoja correspondiente no fue detectada) (datos no mostrados).

El principal interés de este estudio es que nos ha permitido determinar que podemos introducir un BCA en el interior de plantas de vid a través del sistema radicular y que una vez en su interior la actinobacteria tiene la capacidad de diseminarse y colonizar otros tejidos más alejados.

Futuros estudios deberían determinar durante cuánto tiempo una población del BCA puede mantenerse viable en el interior de la planta, desde donde desarrollar su efecto beneficioso.

Efecto protector sobre plantas jóvenes: ensayos en viñedo

A continuación centramos nuestro interés en analizar su posible efecto protector en viñedos de nueva plantación. El estudio se ha realizado sobre un viñedo de nueva plantación (año 2017) de 900 plantas utilizando las 3 actinobacterias más prometedoras según estudios previos: las cepas *Streptomyces* sp. VV/E1, VV/R1 y VV/R4. Estas cepas se inocularon, solas o en combinación (VV/E1 + VV/R1 y VV/E1 + VV/R4), en plantas de 1 año suministradas por Viveros Villanueva Vides S.L., de modo que cada tratamiento se aplicó a un grupo de 150 plantas, utilizando 150 plantas sin tratar como control negativo.

Aunque el estudio todavía está en progreso, los resultados preliminares corroboran lo previamente observado para la aplicación de las actinobacterias a injertos de vid:

- El tratamiento con estos BCAs no tiene ningún efecto negativo sobre la aplicación de las plantas de vid: su desarrollo es normal en cuanto a crecimiento y no se aprecia un incremento en determinados marcadores de estrés (peroxidación lipídica y actividad guayaacol peroxidasa) respecto de las plantas control no tratadas.
- La aplicación de las bacterias VV/E1 y VV/R4 produjo una disminución del número de los hongos patógenos analizados e implicados en pie negro y enfermedad de Petri del 63,8% y 55,3%, respectivamente.

Por el contrario, en el caso de la bacteria VV/R1, el descenso observado fue sólo del 12,8%.

- El efecto protector fue detectado frente a los patógenos del grupo *Ilyonectria-Dactylonectria* (pie negro) y frente a las especies *P. chlamydospora* y *Ph. minimum* (enfermedad de Petri).
- La aplicación conjunta de las dos cepas VV/E1 y VV/R4 no mejoraba el efecto protector de ambas cepas por separado.

Por último, señalemos que recientemente Martínez-Diz y col. (2020) han comparado el efecto protector de varios BCAs (comerciales o en desarrollo) frente a patógenos implicados en pie negro y enfermedad de Petri. En este estudio se han utilizado las cepas *Streptomyces* sp. VV/E1 y VV/R4 aplicadas conjuntamente y los resultados presentados por los autores indican una muy alta eficiencia de estas actinobacterias para el control del pie negro, aunque en este estudio no se ha observado efecto protector frente a la enfermedad de Petri.

Las diferencias observadas entre ambos estudios pueden deberse a las diferentes metodologías empleadas o a, como los autores indican, otros factores responsables de un comportamiento impredecible de los BCAs cuando se prueban en diferentes ambientes y condiciones.

En cualquier caso, en este trabajo se aprecia que ninguno de los BCAs probados (tres preparados comercia-

les a base de cepas de *Trichoderma* y dos preparados a base de actinobacterias y *Pythium oligandrum*) han sido capaces de controlar de manera efectiva todos los hongos, mostrando cada uno de ellos una mayor actividad frente a un tipo de patógenos, pero deficiencias frente a otros patógenos. Por ello, los autores sugieren un posible uso combinado de diferentes tipos de BCAs como mejor estrategia en el contexto de un manejo integrado de este grave problema.

Conclusiones prácticas

Las conclusiones prácticas que podemos extraer de este estudio son las siguientes:

- El entorno del sistema radicular de plantas de vid es un ambiente a partir del cual aislar BCAs para el tratamiento de enfermedades de madera de vid.
- Las actinobacterias son un grupo microbiano muy prometedor para su empleo en el control de las enfermedades de madera de vid provocadas por hongos que penetran a través del aparato radicular y fundamentalmente implicadas en

patologías como el pie negro y la enfermedad de Petri, asociadas al decaimiento de viñedos jóvenes.

- Las cepas de actinobacterias seleccionadas se pueden aplicar fácilmente a las plantas de vid mediante su inmersión en una suspensión bacteriana como paso previo a su plantación, siendo capaces de establecerse y colonizar el interior de la planta, sobre todo a nivel del sistema radicular.
- En estos momentos, diferentes BCAs desarrollados son la mejor herramienta existente para el control de estas patologías en viñedos de nueva plantación.

Agradecimientos

Los resultados aquí reflejados son fruto de dos proyectos de investigación financiados por Viveros Villanueva Vides S.L. (Larraga, Navarra). A su vez VVV ha sido financiado a través del Gobierno de la Comunidad Foral de Navarra y el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI, Madrid) a través del proyecto GLOBALVITI (programa CIEN). SGG ha disfrutado de una ayuda FPU (número

FPU15/03475) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Madrid). RC ha sido financiada a través del programa Torres Quevedo (ayuda PTQ-14-06849). AMI y ADG son financiadas por becas predoctorales de la Junta de Castilla y León. CCP disfruta de un contrato de técnico cofinanciado por la Iniciativa de Empleo Juvenil (Junta de Castilla y León) y el Fondo Social Europeo.

Summary

Several strains of actinobacteria isolated from the root environment of young grapevine plants from Viveros Villanueva Vides S.L. (Larraga, Navarra) have shown a high *in vitro* antifungal activity against some pathogenic fungi involved in Blackfoot and Petri disease. These pathologies are involved in young grapevine decline. A selection of six of these strains, belonging to the *Streptomyces* genus, when were applied in the field on vine grafts, were able to significantly reduce the infection of grapevine plants by pathogenic fungi that infect the plant through the root system. Two of them also significantly decreased the level of graft mortality. An effective method to introduce these strains into grapevine plants by immersing the root system in a bacterial suspension has been developed. The plants inoculated in this way, when established in newly planted vineyards, showed a high level of protection against fungi involved in the aforementioned pathologies.

Bibliografía

- ! Álvarez-Pérez, J.M., González-García, S., Cobos, R., Olego, M.A., Garzón-Jimeno, J.E., Coque, J.J.R. 2016. Producto para el control de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de madera de vid y procedimiento para su aplicación en injertos de vid. Patente Española ES2543363-B2
- Álvarez-Pérez, J.M., González-García, S., Cobos, R., Olego, M.A., Ibáñez, A., Díez-Galán, A., Garzón-Jimeno, J.E., y Coque, J.J.R. 2017. Use of Endophytic and Rhizosphere Actinobacteria from Grapevine Plants To Reduce Nursery Fungal Graft Infections That Lead to Young Grapevine Decline. *Applied and Environmental Microbiology* 83: e01564-17.
- Álvarez-Pérez, J.M., González-García, S., Cobos, R., Olego, M.A., Garzón-Jimeno, E., Coque, J.J.R. 2020. Product for controlling phytopathogenic fungi that cause grapevine wood diseases and method for the application thereof in grapevine grafts. European Patent Application. Nº de solicitud: EP16000729.0 (*concedida pero pendiente de publicación definitiva*).
- Coque, J.J.R., Álvarez-Pérez, J.M., Cobos, R., González-García, S., Ibáñez, A.M., Díez-Galán, A., Calvo-Peña, C. 2020. Advances in the control of phytopathogenic fungi that infect crops through their root system. *Advances in Applied Microbiology* 111: <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2020.01.003>.
- González-García, S., Álvarez-Pérez, J.M., Sáenz de Miera, L.E., Cobos, R., Ibáñez, A., Díez-Galán, A., Garzón-Jimeno, E., Coque, J.J.R. 2019. Developing tools for evaluating inoculation methods of biocontrol *Streptomyces* sp. strains into grapevine plants. *PLOS One*: 10.1371/journal.pone.0211225.
- Gramaje, D., Armengol, J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification and management strategies. *Plant Disease* 95: 1040-1055.
- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J.R., Sosnowski, M.R. 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Disease* 102: 12-39.
- Gubler, W.D., Rolshausen, P.E., Trouillas, F.P., Urbez-Torres, J.R., Voegel, T., Leavitt, G.M., Weber, E.A. 2005. Grapevine trunk diseases in California. *Practical Winery and Vineyard Magazine* 6-25.
- Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacteria taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1719-1728.
- Martínez-Diz, M.P., Díaz-Losada, E., Andrés-Sodupe, M., Bujanda, R., Maldonado-González, M.M., Ojeda, S., Yacoub, A., Rey, P., Gramaje, D. 2020. Field evaluation of biocontrol agents against black-foot and Petri diseases of grapevine. *bioRxiv*: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.19.101568>.
- Úrbez-Torres, J.R., Haag, P., Bowen, P., Lowery, T., O’Gorman, D.T. 2015. Development of a DNA microarray for the detection and identification of fungal pathogens causing decline of young grapevines. *Phytopathology* 105 (10): 1373-1388.