



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS AGONÓMICAS
ESCUELA DE PREGADO**

MEMORIA DE TÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA ASOCIADA A FLORES
Y BAYAS DE UVA DE MESA CULTIVAR THOMPSON SEEDLESS**

GONZALO ADOLFO GUTIÉRREZ PICHIPIL

Santiago, Chile

2022



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS AGONÓMICAS
ESCUELA DE PREGADO**

MEMORIA DE TÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA ASOCIADA A FLORES
Y BAYAS DE UVA DE MESA CULTIVAR THOMPSON SEEDLESS**

**CHARACTERIZATION OF FUNGAL MICROBIOTA ASSOCIATED WITH
FLOWERS AND BERRIES OF TABLE GRAPES CULTIVAR THOMPSON
SEEDLESS**

GONZALO ADOLFO GUTIÉRREZ PICHIPIL

Santiago, Chile

2022



UNIVERSIDAD DE CHILE





FACULTAD DE CIENCIAS AGONÓMICAS
ESCUELA DE PREGADO

MEMORIA DE TÍTULO

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA ASOCIADA A FLORES Y BAYAS DE UVA DE MESA CULTIVAR THOMPSON SEEDLESS

Memoria para optar al título
Profesional de Ingeniero Agrónomo

GONZALO ADOLFO GUTIÉRREZ PICHIPIL

		Calificaciones
PROFESOR (A) GUÍA		
Marcela Esterio Grez Ing. Agr. Mg. Cs.		7.0
Jaime Auger Saavedra Ing. Agr. MS. Ph. D.		7.0
PROFESORES EVALUADORES		
Nicola Fiore Ing. Agr. Dr. Cs. Agr.		7.0
Verónica Díaz Ing. Agr. Mg. Cs.		6.8

**Santiago, Chile
2022**

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Hipótesis	6
Objetivos del trabajo	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos	6
Metodología	7
Lugar de estudio.....	7
Materiales.....	7
Origen de los aislados de <i>B. cinerea</i>	7
Software	7
Medios de cultivo.....	8
Recuperación de los microorganismos fúngicos presentes en flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless.....	8
Identificación a nivel de especie de los microorganismos fúngicos aislados mediante filogenia molecular.....	8
Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.....	8
Análisis Filogenético.....	10
Evaluación de la capacidad de competencia in vitro de los microorganismos fúngicos aislados de flores y bayas de vid frente a aislados <i>Botrytis cinerea</i> con pérdida de sensibilidad a fungicidas de interés agronómico.....	10
Evaluación de la sensibilidad a boscalid y fenhexamid de los aislados que inhiben el crecimiento de <i>B. cinerea</i>	12
Evaluación de la patogenicidad de los aislados candidatos a ACB que inhiben el crecimiento de <i>B. cinerea</i> en bayas de vid.....	13
Resultados y discusión	14
Recuperación e identificación de microorganismos fúngicos a través de filogenia molecular.....	14
Especies identificadas por género.....	18
<i>Arthrinium</i>	18
<i>Alternaria</i>	19
<i>Pleosporaceae</i>	21
<i>Fusarium</i>	23
<i>Epicoccum</i>	24
<i>Sordaria</i>	25
<i>Chaetomium</i>	26
<i>Aspergillus</i>	27

<i>Penicillium</i>	28
<i>Talaromyces</i>	32
<i>Cladosporium</i>	33
<i>Diplodia</i>	34
<i>Pestalotiopsis</i>	36
<i>Trichoderma</i>	36
<i>Rhizopus</i>	39
<i>Bjerkandera</i>	40
<i>Coprinellus</i>	41
Evaluación de la capacidad de competencia.....	43
Evaluación de la capacidad de supervivencia en un medio con fungicidas de interés agronómico.....	47
Evaluación de la patogenicidad en bayas de uva de mesa de los candidatos a ACB.....	49
Conclusiones	51
Bibliografía	52

RESUMEN

El sostenido aumento en el tiempo de las cepas de *Botrytis cinerea* resistentes a fungicidas de interés comercial ha suscitado el interés en buscar alternativas de manejo como los agentes de control biológico (ACB). En este estudio se obtuvieron aislados monospóricos a partir de flores y bayas sanas de uva de mesa cv. Thompson Seedless de dos regiones de Chile (Metropolitana y O'Higgins), los que fueron identificados mediante filogenia molecular. Se identificaron 50 especies, sin considerar a *B. cinerea*, la mayoría de éstas han sido catalogadas como patógenos de vides u otros cultivos como *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Rhizopus*. Por otro lado, se identificaron especies de hongos no reportadas en Chile y/o en uva de mesa. Se seleccionaron aquellos no patogénicos y se sometieron a pruebas de crecimiento dual *in vitro* contra dos cepas de *B. cinerea* resistentes a boscalid y fenhexamid; adicionalmente, se evaluó la capacidad de sobrevivencia de los candidatos bajo concentraciones crecientes de boscalid y fenhexamid. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la capacidad de biocontrol de los ACB frente a *B. cinereas*, las cepas resistentes eran menos inhibidas por los ACB que una cepa sensible, lo que indicaría que el problema de la resistencia sería aún más complicado de manejar. El género *Trichoderma* presentó una gran cantidad de aislados de múltiples especies y fue el que mejor desempeño tuvo en las pruebas de biocontrol, tres aislados obtuvieron un porcentaje de inhibición del crecimiento radial >50% y uno de ellos no se vio afectado por ambos fungicidas a ninguna concentración, por lo que se perfila como una opción de ACB aclimatado a vides en Chile y compatible con las aplicaciones de fungicidas.

Palabras clave: Identificación de hongos, filogenia molecular, control biológico, boscalid, fenhexamid, *Botrytis*, *Trichoderma*.

ABSTRACT

The sustained increase over time of resistant strains of *Botrytis cinerea* resistant to commercially available fungicides has raised interest in non-synthetic alternatives products such as plant extracts and biological control agents (BCAs). In this study, monosporic isolates of filamentous fungi were obtained from healthy berries and flowers of table grape cv. Thompson Seedless from two regions in Chile (Metropolitana and O'Higgins), which were identified by molecular phylogeny. From the fungal microbiota, fifty species were identified, excluding *B. cinerea* isolates, most of these species are catalogued as pathogens for grapevine and other plant species, like *Alternaria*, *Penicillium*, *Rhizopus* and *Aspergillus*. Additionally, non-reported fungal species for Chile and/or grapevines were isolated. Those that were not pathogenic were selected for *in vitro* dual growth tests against two strains of *B. cinerea* resistant to boscalid and fenhexamid, in addition, the survival capacity of the candidates was evaluated under increasing concentrations of boscalid and fenhexamid. Dual culture test shown a statistically significant difference between the biocontrol capacity of CBAs against *B. cinerea* resistant strains and sensitive strain, which would indicate that the problem of resistance would be even more difficult to manage. The *Trichoderma* genus presented numerous isolates of multiple species and the best performance in the biocontrol tests, three isolates obtained a percentage of inhibition of the radial growth >50% and one of them was not affected by both fungicides at all concentrations, so it emerges as an acclimatized to grapevines in Chile CBA option, compatible with fungicide applications.

Keywords: Fungal identification, molecular phylogeny, biological control, boscalid, fenhexamid, *Botrytis*, *Trichoderma*.

INTRODUCCIÓN

La ubicación geográfica y la condición agroclimatológica de la zona central de Chile favorecen y explican el exitoso resultado del cultivo de la uva de mesa y para vino (*Vitis vinifera*). En uva de mesa, cuatro variedades dominan actualmente el mercado de exportación: Red Globe, Crimson Seedless, Thompson Seedless (Sultanina) y Flame Seedless abarcando, en conjunto, el 46.3% del volumen de uva fresca exportado por el país (ODEPA, 2022). La variedad blanca más relevante en Chile es Thompson Seedless, caracterizada por una maduración temprana, aunque limitada por la necesidad de aplicación de reguladores de crecimiento y una marcada sensibilidad al fitopatógeno *Botrytis* spp. (Torres, 2017).

El moho gris, como se denomina a la enfermedad causada por *Botrytis cinerea*, es el problema fitopatológico más relevante en uva de mesa, en especial en el cv. Thompson Seedless, generando pérdidas incluso totales de la fruta de exportación en algunas temporadas (Torres, 2017). El principal factor de este fenómeno es la alta plasticidad genética que tiene *Botrytis cinerea*, que le permite establecer en cortos periodos de tiempo pérdidas de sensibilidad a los fungicidas aplicados para su manejo y control; y adicionalmente, por las características genéticas de las variedades de vid (Latorre *et al.*, 2015; Esterio *et al.*, 2017). Actualmente, el control de la pudrición gris en vides se realiza mediante manejo integrado, en donde el control químico es fundamental. El éxito de esta estrategia depende del nivel de sensibilidad de las poblaciones predominantes del patógeno a las diferentes moléculas utilizadas. En el caso de Chile, particularmente impacta la eficiencia de los fungicidas base de los programas de control pertenecientes a las familias hidroxianilidas y carboxamidas, en donde se han observado niveles decrecientes de sensibilidad. (Esterio *et al.*, 2011; Esterio *et al.*, 2017; Esterio *et al.*, 2021).

La presencia de cepas de *B. cinerea* resistentes a estos fungicidas, la preocupación por el impacto ambiental que tienen sus constantes aplicaciones y las crecientes restricciones impuestas por los mercados de destino, que limitan tanto el número de aplicaciones, como el número de productos aplicados y el nivel de residuo, hace necesario el desarrollo de nuevas técnicas de control (Esterio *et al.*, 1992). Entre éstas, destaca la incorporación en los programas de control de alternativas no sintéticas como extractos de plantas, activadores de mecanismos de defensa y Agentes de Control Biológico (ACB) (Esterio *et al.*, 1992; Auger y Esterio, 1997), que se perfilan como herramientas ambientalmente amigables, proyectando la reducción del uso de fungicidas y, consecuentemente, minimizando el riesgo de desarrollo de cepas de *Botrytis cinerea* resistentes a fungicidas (Auger y Esterio, 1997; Montealegre y Pérez, 2013).

El control biológico actualmente se basa en la aplicación de preparaciones comerciales de diferentes hongos y bacterias para varios usos agrícolas como cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos (Carreras, 2011) y numerosas especies de *Trichoderma* utilizados como biofungicidas y/o inductores de crecimiento (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Los

mecanismos de acción de estos productos pueden ser directos, como el micoparasitismo y antibiosis que inhiben el crecimiento del patógeno e indirectos a través de la inducción de la respuesta de defensa y crecimiento de la planta. Adicionalmente, existe la secreción de enzimas hidrolíticas por parte de los ACB, presión y competencia por espacio y nutrientes, así como la detoxificación de factores de virulencia, que son otras formas en que hongos antagonistas pueden hacer frente a enfermedades en la planta (Sempere y Santamarina 2007; Thambulaga *et al.*, 2020).

En consecuencia, la clave para desarrollar un producto comercial en base a un ACB radica en encontrar aislados de especies de microorganismos que sean capaces de ejercer alguno de los mecanismos de acción antes mencionados. Es fundamental, además, que sean capaces de crecer *in vitro* y que puedan sobrevivir en ambientes con presencia de fungicidas. Considerando que los ACB actúan sobre ciertos tejidos de la planta, es coherente buscar ACB candidatos en el mismo tejido de la planta hospedera o nicho ecológico completo. Existe una amplia literatura respecto de los microorganismos asociados a la vid, es así que microorganismos endófitos y epífitos han sido detectados en la raíz, tallos, flores y bayas (Gilbert *et al.*, 2014). Por otro lado, las investigaciones han revelado que las poblaciones de microorganismos pueden variar entre cultivar, localización geográfica, clima e incluso durante la temporada y son impactados significativamente por diferentes manejos agronómicos (Bokulich *et al.*, 2014; Pancher *et al.*, 2012).

Los microorganismos ejercen relaciones tróficas con la planta hospedera, generalmente de tipo comensalista, donde sobreviven al interior de su hospedero sin generar un impacto negativo en los tejidos de la planta (Violi *et al.*, 2007). Adicionalmente, la relación puede ser del tipo parasítica o mutualista, por lo que es normal encontrar microorganismos considerados patógenos en estado latente, los que bajo condiciones favorables desencadenan enfermedades en la planta, incluyendo la pudrición por *Botrytis* spp. (Pancher *et al.*, 2012). Actualmente, se han desarrollado métodos que permiten caracterizar las comunidades microbiológicas mediante el análisis masivo de datos de secuenciación de una muestra ambiental – metagenómica - (Schloss, 2020). Sin embargo, la caracterización y definición de especies ha estado íntimamente ligada, en las últimas décadas, con análisis moleculares que utilizan filogenias basadas en análisis multilocus de genes de interés (Woudenberg *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2021).

Los análisis multilocus permiten visualizar las relaciones filogenéticas a partir de diferencias entre múltiples secuencias bajo estudio, lo que ha permitido redefinir taxonomías completas de un gran número de especies y aún quedan muchas otras por definir (Crous y Groenewald, 2013; Asgari *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017a; Maharachchikumbura *et al.*, 2014). En esta misma línea la adopción del concepto “one fungus one name”, ha permitido unificar los nombres científicos de las formas sexuales y asexuales de una misma especie, dejando obsoleto el concepto de anamorfo y teleomorfo (Hawksworth *et al.*, 2011).

Los miembros de la microbiota fúngica reportados en vides se restringen principalmente a los patogénicos, debido a su interés comercial. Dentro de las enfermedades más comunes generadas por hongos en bayas de vides, se encuentran la pudrición gris ocasionada por *Botrytis cinerea* y la pudrición ácida, la cual es producida por un complejo de hongos entre los que se encuentran los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Rhizopus* (Torres, 2017). Además, la vid es afectada por *Erysiphe necator*, agente causal del oídio de la vid, hongo

biotrófico que afecta la calidad y cantidad de la producción, pero que no está asociado a pudriciones (Massi *et al.*, 2021).

El primer libro recopilatorio de la flora fungosa identificada en Chile fue realizado en 1980 por Torres y Mujica, posteriormente, en 2010 Acuña elaboró un compendio de hongos y bacterias presentes en frutales y vides en Chile, si bien la nomenclatura y delimitación de especies en estos catálogos no está actualizada, se pueden evidenciar los géneros y las especies descritas en Chile, las que incluyen; *Alternaria*, compuesto de hongos cosmopolitas causantes de enfermedades en plantas y humanos, cuya especie tipo *Alternaria alternata* está asociada a la pudrición ácida, pudrición del racimo y mohos verdes de la vid (Woudenberg *et al.*, 2015). Luego, el género *Penicillium* con varias especies reportadas en Chile causantes de pudrición del racimo como *P. chrysogenum*, y *P. wortmanni*, además de *P. expansum* que también está asociado a pudrición ácida y mohos azules. *Aspergillus*, un género con especies endófitas en el racimo de la vid, como *A. niger*, *A. niveus*, *A. paradoxus*, *A. versicolor*, *A. wentii* y *A. westerdijkiae*, que producen pudriciones y problemas en postcosecha. Varios géneros asociados a la pudrición del racimo tienen especies identificadas en Chile, como *Rizhopus* (*R. stolonifer*), *Epicoccum purpuracens* y *Cladosporium* (*C. herbarum*, *C. cladosporoides*).

El estudio y caracterización de la diversidad de las comunidades fúngicas en la vid, permitirá evaluar potenciales ACB contra *Botrytis cinerea* los que al estar presentes endógenamente en la vid ofrecen una mayor probabilidad de éxito por habitar naturalmente el nicho ecológico de interés. Este estudio consistió en: (i) evaluar la diversidad de los microorganismos fúngicos cultivables, con objeto de encontrar potenciales ACB en distintos estadios fenológicos de la vid, (ii) establecer su capacidad de competencia con *Botrytis cinerea*, el principal patógeno fungoso que afecta a esta importante especie tanto en Chile como a nivel mundial y (iii) Evaluar la capacidad de crecimiento de los aislados en ambientes con fungicidas de interés agronómico.

HIPÓTESIS

En flores y bayas del cv. Thompson Seedless existe al menos un hongo con capacidades de ser controlador biológico de *B. cinerea*.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Objetivo general

Identificar a nivel de especie los principales organismos que forman parte de la microbiota fúngica de flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless en Chile y evaluar su capacidad como controlador(es) biológico(s) de *B. cinerea*.

Objetivos específicos

- 1.- Recuperar los microorganismos fúngicos presentes en flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless.
- 2.- Identificar los microorganismos fúngicos aislados, a nivel de especie, a través de filogenia molecular.
- 3.- Caracterizar parámetros de crecimiento y desarrollo de los microorganismos fúngicos seleccionados frente a aislados de *Botrytis cinerea* que presentan pérdida de sensibilidad a fungicidas de interés agronómico, mediante pruebas de competencia y sensibilidad *in vitro*.

METODOLOGÍA

Lugar de estudio

Las muestras de flores y bayas de vides fueron colectadas de predios ubicados en la Región del Libertador Bernardo O'Higgins y en la Región Metropolitana, Chile.

El trabajo de aislamiento, incremento y pruebas de competencia de microorganismos se realizó en el laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular del Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

El trabajo de extracción y amplificación de ADN, así como los análisis de filogenia, fueron realizados en la unidad de biología molecular del mismo laboratorio.

Materiales

Origen de los aislados de *B. cinerea*

- Aislado *B. cinerea* resistente a Boscalid (fdb613c) obtenido del cepario del laboratorio (Esterio *et al.*, 2021)
- Aislado *B. cinerea* (fbb61c) resistente a Fenhexamid obtenido del cepario del laboratorio (Esterio *et al.*, 2021)
- Aislado *B. cinerea* (fdb8-3c3) sensible absoluto obtenido del cepario del laboratorio (Esterio *et al.*, 2015)

Software

- (1) Bioedit (Hall, 1999).
- (2) MEGA (Kumar *et al.*, 2018).
- (3) INFOSTAT (Balzarini *et al.*, 2008)

Medios de cultivo

- Agar Papa Dextrosa (APD)
- Agar Agua (AA)
- Sisler (SS) (Leroux *et al.*, 1999)

Recuperación de los microorganismos fúngicos presentes en flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless.

Se colectaron muestras de un predio de la región Metropolitana y uno de la región de O'Higgins. El cuartel de los predios en estudio fue dividido en 6 sectores desde donde se recolectaron 400 flores, con un total de 2400 flores por cuartel. Para el caso de las bayas, se realizó el mismo procedimiento, recolectándose 400 bayas por sector con un total de 2400 bayas por cuartel. Las tijeras de poda fueron desinfectadas entre cada muestreo. Se sembraron todas las flores en placas de Petri de vidrio de 20 cm de diámetro, conteniendo medio AA, con un total de 50 flores por placa.

Las placas fueron incubadas en oscuridad continua a 22°C durante 14 días, en espera del desarrollo de los hongos, tiempo después del cual cada crecimiento fungoso morfológicamente diferente desarrollado en el tejido fue extraído y aislado. Posteriormente, desde cada uno de estos se realizaron cultivos monospóricos, para ello se extrajo una pequeña porción de material fungoso (conidias y/o micelio) que se dispuso en agua destilada estéril. Entonces se agregaron 3 gotas del detergente Tween 80 para disgregar el tejido fúngico y luego se traspasaron entre 20-200 µL de la suspensión a una placa de Petri con medio APD, manteniéndose en incubación a 22°C por 24 horas en oscuridad continua. Con ayuda de un microscopio óptico convencional de transferencia de luz se traspasaron conidias o micelio que estuviera aislado del resto del tejido a una placa con APD fresco para obtener cultivos monoconidiales o monohifales según fuese el caso.

Identificación a nivel de especie de los microorganismos fúngicos aislados mediante filogenia molecular**Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.**

Cada aislado monospórico se replicó en una placa con medio ADP y se mantuvo a 23°C durante 7-15 días. Entonces, aproximadamente 100mg de tejido del hongo fueron almacenados en un tubo criogénico (Merck) para ser mecánicamente triturado utilizando esferas de acero en el equipo TYSSUE LYSER 2 (QIAGEN) a 30 Hz por 2,5 minutos a -10°C. Luego, el tejido pulverizado fue usado para la extracción de ADN utilizando el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) bajo las recomendaciones del

fabricante, El ADN purificado fue evaluado en su concentración y calidad (razones 260/280 y 260/230) en un equipo EPOCH Microplate Spectrophotometer/Take3 Multi-Volume Plate. Los partidores fueron sintetizados por la empresa IDT y las amplificaciones mediante PCR se realizaron en un volumen total de 20 μ L, conteniendo 1x GoTaq® Master Mix (Promega), 0,2 μ M de cada partidador y 50-100 ng de ADN genómico, completando el volumen con agua nanopura (Promega). La amplificación fue evaluada a través de electroforesis en geles de agarosa al 2%, revelado usando RedGel (Biotium) y luz ultravioleta en un transiluminador. El producto de PCR fue purificado y secuenciado en ambas direcciones por la empresa PSOMAGEN USA.

Las secuencias de consenso han sido obtenidas utilizando el programa BioEdit v7.0.4.1 (Hall, 1999), y fueron contrastadas con la base de datos RefSeq del National Center for Biotechnology Information, USA (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a través de la herramienta Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) a fin de obtener un primer acercamiento de la categoría taxonómica de cada aislado.

Los partidores utilizados y las referencias desde donde fueron obtenidos los perfiles de amplificación por PCR, se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Detalle de partidores utilizados en este estudio para la identificación de especies fúngicas asociadas a uva de mesa.

Región	Nombre Partidores	Secuencia 5'-3'	Referencia
ITS	<i>ITS1</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)
	<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
LSU	<i>LROR</i>	ACCCGCTGAACTTAAGC	Rehner y Samuels (1994)
	<i>LR7</i>	TACTACCACCAAGATCT	Vilgalys y Hester (1990)
GPDH	<i>GPD1</i>	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	Berbee <i>et al.</i> (1999)
	<i>GPD2</i>	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	
TEF1	<i>TEF2-728f</i>	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbone y Kohn (1999)
	<i>EF1-986r</i>	TACTTGAAGGAACCCTTACC	Jaklitsch <i>et al.</i> (2005)
	<i>TEF1LLErev</i>	AAC TTG CAG GCA ATG TGG	
BenA	<i>BT2fw</i>	GTBCACCTYCARACCGGYCARTG	Aveskamp <i>et al.</i> (2009)
	<i>BT4rd</i>	CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC	Glass y Donaldson (1995)
	<i>BT2a</i>	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	
	<i>BT2b</i>	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
RPB2	<i>fRPB2-5F</i>	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Liu, Whelen y Hall (1999)
	<i>fRPB2-7cR</i>	CCCATRGTGTYTTRCCCAT	Chen y Zhuang (2016)
	<i>tRPB2-5F</i>	TTG(G/T)AAAGAA(A/G)CGTCTGGAT	
	<i>tRPB2-7R</i>	(C/T)(A/G)(A/G)CATACCTGGTTGTG	
ACT	<i>ACT-512F</i>	9ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone y Kohn (1999)
	<i>ACT-783R</i>	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
CaM	<i>CMD5</i>	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	Hong <i>et al.</i> (2005)
	<i>CMD6</i>	CCGATAGAGGTCATAACGTGG	

Análisis Filogenético.

Utilizando la herramienta BLASTn se identificaron los géneros de los aislados fungosos obtenidos utilizando la información entregada por la región ITS. Los datos fueron adicionalmente validados a través de observaciones macro y microscópicas de las estructuras de cada aislado utilizando las claves taxonómicas disponibles en la literatura.

Para ello micelio y conidias desde placas de 14 días fueron extraídos usando una pipeta Pasteur y montadas en un portaobjeto, luego las muestras fueron fijadas y teñidas utilizando azul de metileno, compuesto que se une a sustancias ácidas que se tiñen color azul permitiendo revelar la estructura del hongo. Las muestras fijadas fueron observadas mediante microscopia convencional utilizando un microscopio LEICA TW-150 con un objetivo 4X.

A partir de esta información se consideró el análisis de genes “housekeeping” adicionales, de acuerdo con la información disponible en la literatura, para cada género de las especies detectadas. El total de secuencias de cada gen fue estudiado en forma separada o concatenadamente, de acuerdo con lo establecido para cada especie. Se integró en los análisis las secuencias de referencia reportadas en la literatura (Cuadro 2). El alineamiento de secuencias se realizó a través de Clustal W desde el programa BioEdit v7.0.4.1 (Hall, 1999) y fue depurado utilizando el algoritmo G-Blocks, para aislar las regiones más informativas del alineamiento (Talavera y Castresana, 2007). La concatenación de genes, así como la realización y visualización de la inferencia filogenética fue realizada utilizando el programa MEGAX (Kumar *et al.*, 2018) a través del método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood), modelo de sustitución nucleotídica general time-reversible (GTR), distribución gamma y Bootstrap con 1000 repeticiones mínimo.

Luego de obtener la identificación de especies individualizadas, se calculó un parámetro de diversidad, el Índice de diversidad de Simpson $D_s = \sum n_i (n_i - 1) / N (N - 1)$, donde n_i es el número de organismos que pertenecen a la especie i y N el número total de organismos (Simpson, 1949).

Evaluación de la capacidad de competencia *in vitro* de los microorganismos fúngicos aislados de flores y bayas de vid frente a aislados *Botrytis cinerea* con pérdida de sensibilidad a fungicidas de interés agronómico.

Del total de aislados fungosos obtenidos se seleccionaron aquellos que no estuvieran relacionados con enfermedades en vides (Cuadro 3). Los aislados de las especies seleccionados y las 3 cepas de *Botrytis cinerea* utilizadas (aislados con pérdida de sensibilidad a fenhexamid, boscalid y sensible absoluto) fueron multiplicados en placas con medio APD. Todos los cultivos fueron incubados a 22°C bajo obscuridad continua. Luego de 7 días se generaron discos de micelio de 5 mm de diámetro, entonces se dispuso un disco de *Botrytis cinerea* frente a un disco del microorganismo seleccionado en una placa de 80mm de diámetro con medio PDA fresco, de acuerdo con el método del cultivo dual descrito en Dennis y Webster (1971). Posteriormente, las placas fueron incubadas a 22°C en oscuridad continua y evaluadas 7 días más tarde. Se midió el radio de crecimiento de cada colonia de *Botrytis* y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) con la fórmula

$PICR = (Rb - Rbc) * \frac{100}{Rb}$, donde Rb es el crecimiento radial de la colonia del *Botrytis cinerea* (tratamiento testigo) y Rbc es el crecimiento radial de *Botrytis* en el cultivo dual con el tratamiento. Se realizaron 3 repeticiones y cada repetición del experimento fue realizada en tiempos diferentes.

Los datos obtenidos en las evaluaciones se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba Tukey de medias comparadas a un nivel de 5%. (Correa *et al.*, 2007) utilizando el software estadístico InfoStat (Balzarini *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Partidores utilizados para amplificar regiones filogenéticamente informativas y secuencias de referencia para cada género de especies fúngicas aisladas desde flores y bayas de vid.

Géneros	Región		Partidores							Referencia
	ITS	LSU	TEF	GPDH	RPB2	CMD	BenA	ACT		
<i>Alternaria</i>	ITS1-ITS4	LROR -LR7	982r-728f	gpd1 gpd2	5f-7cr				Woudenberg <i>et al.</i> (2013)	
<i>Arthrinnium</i>	ITS1-ITS4	LROR -LR7					BT2a-BT2b		Crous y Groenewald (2013)	
<i>Aspergillus</i>	ITS1-ITS4					CMD5-CMD6			Samson <i>et al.</i> (2014)	
<i>Bipolaris</i>	ITS1-ITS4	LROR -LR7	982r-728f	gpd1 gpd2	5f-7cr				Ariyawansa <i>et al.</i> (2015)	
<i>Bjerkandera</i>	ITS1-ITS4	LROR -LR7							Wang <i>et al.</i> (2021)	
<i>Chaetomium</i>	ITS1-ITS4	LROR -LR7					BT2a-BT2b		Asgari y Zare (2011)	
<i>Cladosporium</i>	ITS1-ITS4	LROR -LR7						512f-783r	Bensch <i>et al.</i> (2012)	
<i>Coprinellus</i>	ITS1-ITS4								Huang y Bau (2018)	
<i>Diplodia</i>	ITS1-ITS4								Güngör y Yildiz (2021)	
<i>Epicoccum</i>	ITS1-ITS4	LROR -LR7			5f-7cr		BT4Rd-BT2Fw		Ayim <i>et al.</i> (2020)	
									Oliveira <i>et al.</i> (2018)	
									Favarole <i>et al.</i> (2011)	
									Chen <i>et al.</i> (2017)	
<i>Exserohilum</i>	ITS1-ITS4	LROR -LR7		gpd1 gpd2					Ariyawansa <i>et al.</i> (2015)	
<i>Fusarium</i>	ITS1-ITS4		EF1-EF2		5f-7cr				Crous <i>et al.</i> (2021)	
<i>Penicillium</i>	ITS1-ITS4					CMD5-CMD6	BT2a-BT2b		Houbraken <i>et al.</i> (2014)	
									Jang <i>et al.</i> (2011)	
<i>Pestalotiopsis</i>	ITS1-ITS4		EF1-728F/EF2				BT2a-BT2b		Ariyawansa (2018)	
<i>Rhizopus</i>	ITS1-ITS4		728f986r					512f-783r	Abe <i>et al.</i> (2010)	
<i>Sordaria</i>	ITS1-ITS4	LROR -LR7					BT2a-BT2b		Cai y Hide (2006)	
<i>Talaromyces</i>	ITS1-ITS4				5f-7cr		BT2a-BT2b		Yılmaz <i>et al.</i> (2014)	
<i>Trichoderma</i>	ITS1-ITS4		728f986r		t5f-t7cr				Cai y Druzhinina (2021)	

Cuadro 3. Géneros fungosos identificados en uva de mesa cv. Thompson Seedless y su relación ecológica con vides usado como criterio para la selección de candidatos en pruebas de competencia dual contra *B. cinerea*.

Género	Condición	Candidato	Referencia
<i>Alternaria</i>	Patógeno de vides	no	Acuña (2010)
<i>Arthrinium</i>	Endófito de plantas	si	Crous y Groenewald (2013)
<i>Aspergillus</i>	Patógeno de vides	no	Acuña (2010)
<i>Bipolaris</i>	Patógeno de humanos y plantas	no	Ariyawasa <i>et al.</i> (2015)
<i>Bjerkandera</i>	Patógeno de frambueso y kiwi	no	Acuña (2010)
<i>Chaetomium</i>	Potencial biocontrolador	si	Soytong y Kanokmedhakul (2017)
<i>Cladosporium</i>	Patógeno de vides	no	Acuña (2010)
<i>Coprinellus</i>	s/i	si	
<i>Diplodia</i>	Patógeno de vides	no	Acuña (2010)
<i>Epicoccum</i>	Patógeno de vides	si	Acuña (2010)
<i>Exserohilum</i>	Patógeno de humanos y plantas	no	Ariyawasa <i>et al.</i> (2015)
<i>Fusarium</i>	Patógeno de vides	no	Acuña (2010)
<i>Penicillium</i>	Patógeno de vides	no	Acuña (2010)
<i>Pestalotiopsis</i>	Patógeno de arandanos y avellan	no	Acuña (2010)
<i>Rhizopus</i>	Patógeno de vides	no	Ariyawansa <i>et al.</i> (215)
<i>Sordaria</i>	Posible candidato	si	Acuña (2010)
<i>Talaromyces</i>	Patógeno de humanos, potencial ACB	si	Thambulaga <i>et al.</i> (2020) Yilmaz <i>et al.</i> (2014)
<i>Trichoderma</i>	ACB	si	Thambulaga <i>et al.</i> (2020)

Evaluación de la sensibilidad a boscalid y fenhexamid de los aislados que inhiben el crecimiento de *B. cinerea*.

Los aislados que presentaron un PICR mayor al control fueron sometidos a pruebas de sensibilidad a boscalid y fenhexamid. Para ello, se sembraron discos de micelio de 5 mm de diámetro de los aislados seleccionados en Placas de 80 mm de diámetro con medio APD y AA enmendado con boscalid a las siguientes concentraciones 0, 0.05, 0.1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, para fenhexamid se enmendó medio SS con las siguientes concentraciones 0, 0.003, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 $\mu\text{g/mL}$. En ambos casos se realizaron 3 repeticiones y el experimento completo fue repetido dos veces independientemente. El diámetro de crecimiento micelial (mm) se evaluó luego de 5 días de incubación en oscuridad continua a 22°C, momento en que los aislados controles a 0 $\mu\text{g/mL}$ en ambos fungicidas colonizaron toda el área de la placa.

Evaluación de la patogenicidad de los aislados candidatos a ACB que inhiben el crecimiento de *B. cinerea* en bayas de vid.

Con el propósito de evaluar una eventual patogenicidad de los aislados candidatos sobre bayas de uva de mesa, se realizó una prueba de patogenicidad *in vitro*, en la que bayas sanas de uva de mesa cv. Thompson Seedless fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito al 5% durante 1 minuto, luego enjuagadas con agua destilada estéril y secadas a temperatura ambiente (18-22°C) sobre papel absorbente previamente esterilizado. Posteriormente para cada aislado se prepararon suspensiones conidiales a una concentración de 7×10^4 conidias/mL (Sánchez *et al.*, 2013), desde la que se inoculó 12 bayas sin herida con 20 μ L y una placa con medio APD con 200 μ l, para confirmar la viabilidad de las esporas. Las bayas inoculadas fueron incubadas en cámaras húmedas a 22°C en oscuridad continua y fueron evaluadas a los 3, 5 y 7 días, midiéndose el diámetro de la lesión y la incidencia de lesiones como (bayas sintomáticas/ bayas evaluadas) con la finalidad de evaluar el desarrollo de heridas o pudriciones en la baya.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuperación e identificación de microorganismos fúngicos a través de filogenia molecular

A través del análisis de la región ITS (INTERNAL TRANSCRIBER SPACER) mediante la herramienta BLASTn se agruparon los 84 aislados recuperados en 18 géneros de especies: *Alternaria*, *Arthrinium*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Bjerkandera*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Coprinellus*, *Diplodia*, *Epicoccum*, *Exserohilum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Rhizopus*, *Sordaria*, *Talaromyces* y *Trichoderma*. La identificación a nivel de especie mediante filogenia molecular fue alcanzada, utilizando una, dos o tres secuencias nucleotídicas adicionales de regiones génicas informativas según la literatura. Sin embargo, un grupo de aislados, equivalente al 22% del total, no pudo ser identificado a nivel de especie utilizando esta estrategia. La falta de agrupamiento de estos aislados con especies reportadas dentro de cada género sugiere la presencia de especies no caracterizadas.

Los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Diplodia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus* estaban previamente reportados en vides en Chile (Acuña, 2010). Del total de aislados, el 85% pertenece al Phylum Ascomycota, 10% al Basidiomycota y 5% al Zygomycota.

Las diferencias poblacionales entre localidad y temporalidad son presentadas en la Figura 1. Considerando el total de datos, el género más abundante fue *Alternaria* seguido de *Penicillium*, lo que se condice con estudios previos en bayas de *Vitis vinifera* (Oliveira *et al.*, 2017). En bayas de vid vinífera se presentaron resultados en común con los obtenidos en este estudio como la presencia de *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum* y *Penicillium*, adicionalmente, coinciden en que las comunidades fúngicas muestran patrones geográficos diferentes en bayas (Bokulich *et al.*, 2014; Steenwerth *et al.*, 2021). Por otro lado, aunque *Trichoderma* había sido reportado en bayas de uva de mesa, en este estudio aparece con una gran diversidad y abundancia de especies (Diguta *et al.*, 2011).

Se detectaron microorganismos cuyo nicho es la madera de los frutales, identificándose al patógeno *Diplodia seriata*, agente fungoso responsable de la enfermedad de la madera descrita como “*Botryosphaeria dieback*” en uva de mesa cv. Thompson Seedless (Tabilo, 2014).

Adicionalmente, se identificaron especies de Basidiomycotas de los géneros *Coprinellus* y *Bjerkandera* en lugares no aptos para su fructificación como las flores y bayas. *Coprinellus* fructifica preferentemente en estiércol (Huang *et al.*, 2018) por lo que su presencia en baya posiblemente está relacionada con el tipo de dispersión de las estructuras sexuales del hongo. Ambos géneros de Basidiomycota no han sido descritos en vides en Chile previamente.

En particular, las especies más abundantes fueron *Alternaria arborecens*, *Epicoccum italicum*, *Penicillium crocicola* y *Alternaria sp5.*, el detalle de especies y diversidad se

encuentra descrito en el Cuadro 4. De entre los géneros con más especies, *Alternaria* fue el más abundante con 19 aislados totales. Presentó una riqueza de 7 especies y un Índice de Simpson (Ds) de 0,83, seguido de *Penicillium*, con una abundancia de 15 aislados, riqueza de 6 especies y un Ds=0,85 y finalmente *Trichoderma* con 11 aislados y un Ds=0,98. La diversidad medida mediante el Ds obtenida de cada región y estadio fenológico, así como del total de hongos obtenidos desde vid, fue alta (>0,9), otros estudios de microbiota fúngica en vides muestran diversidades máximas >0,5 (Zhang *et al.*, 2019). Este resultado puede estar influenciado por la metodología utilizada, ya que la diversidad medida en unidades taxonómicas operativas, entendidas como grupos de especies utilizadas para establecer relaciones filogenéticas en estudios de metagenómica, podría ser mucho menor que medida en especies identificadas individualmente bajo condiciones de cultivo.

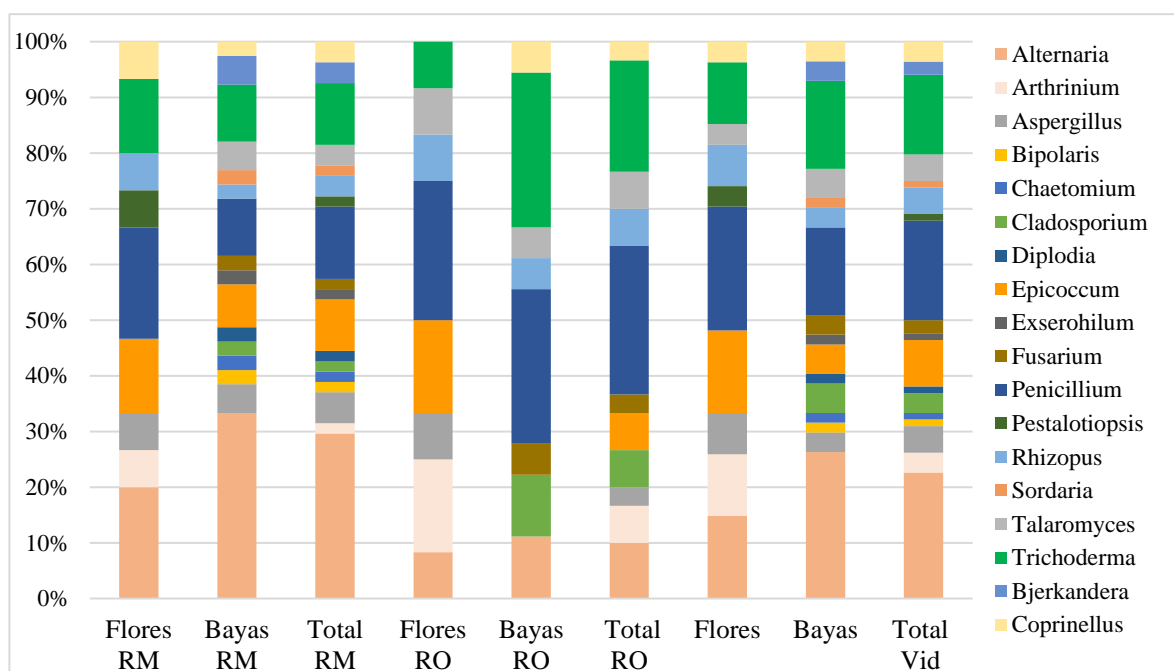


Figura 1. Composición a nivel de género de la microbiota fúngica asociada a flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless en dos regiones de Chile durante la temporada 2020-2021. Los datos excluyen a *Botrytis cinerea*.

Por otro lado, se observaron variaciones en la composición de la microbiota entre estadios fenológicos. Un número menor de aislados fueron colectados de flores respecto a bayas. Además, se detectó que la diversidad en la región Metropolitana fue mayor y concentró como característica definitoria una mayor abundancia de *Alternaria*, mientras que en la región de O'Higgins *Penicillium*, fue el más abundante. Las condiciones ambientales son consideradas uno de los principales moduladores de la diversidad de microorganismos (Pavan *et al.*, 2021), en este estudio se registró una diferencia promedio de 1,4°C y 1,2% HR entre ambas regiones durante las fechas de muestreo, siendo la región de O'Higgins la de mayor temperatura media y menor humedad relativa (HR), lo que podría haber condicionado los resultados de diversidad obtenidos.

Es importante destacar que numerosos microorganismos fúngicos no pueden ser recuperados en medio de cultivo. Una de las principales razones corresponde a la condición biotrófica que estos organismos mantienen con la planta, por lo tanto, no son capaces de sobrevivir fuera del material vivo, como por ejemplo *Erysiphe necator* (Massi *et al.*, 2021). Adicionalmente, solo se realizaron cultivos monospóricos de hongos filamentosos, por lo que los hongos levaduriformes no fueron considerados para el análisis. Finalmente, se debe considerar que debido al objetivo del estudio y a la abundancia de crecimiento, los aislados de *Botrytis cinerea* no fueron considerados en el análisis de diversidad, de todas maneras, se colectaron en búsqueda de especies crípticas a *B. cinerea* como *B. pseudocinerea* y *B. prunorum* (Walker *et al.*, 2011; Esterio *et al.*, 2020), pero ninguna de éstas fue identificada en este estudio.

Cuadro 4. Especie, frecuencia, procedencia e índice de diversidad de Simpson de los aislados obtenidos desde flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless recuperados en la temporada 2020-2021 en dos regiones de Chile.

Filo	Género	Nombre científico	Metropolitana			Región de O'Higgins			Total		
			Flores	Bayas	Total	Flores	Bayas	Total	Flores	Bayas	Total
Ascomycota	<i>Alternaria</i>	<i>A. arborecens</i>	1	3	4	1	1	2	2	4	6
	<i>Alternaria</i>	<i>A. multiformis</i>		1	1					1	1
	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria sp1</i>		1	1					1	1
	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria sp2</i>		1	1					1	1
	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria sp3</i>	1	2	3				1	2	3
	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria sp4</i>		1	1		1	1		2	2
	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria sp5</i>	1	4	5				1	4	5
	<i>Arthrinium</i>	<i>A. kogelbergense</i>				2		2	2		2
	<i>Arthrinium</i>	<i>Arthrinium sp.</i>	1		1				1		1
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus sp1</i>		2	2					2	2
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus sp2</i>	1	1	1	1		1	2		2
	<i>Bipolaris</i>	<i>B. cynodontis</i>		1	1					1	1
	<i>Chaetomium</i>	<i>C. elatum</i>		1	1					1	1
	<i>Cladosporium</i>	<i>C. arthropodii</i>		1	1					1	1
	<i>Cladosporium</i>	<i>C. australiense</i>						1	1	1	1
	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium sp1</i>						1	1	1	1
	<i>Diplodia</i>	<i>D. seriata</i>		1	1					1	1
	<i>Epicoccum</i>	<i>E. italicum</i>	2	3	5	1		1	3	3	6
	<i>Epicoccum</i>	<i>E. layuense</i>				1		1	1		1
	<i>Exserohilum</i>	<i>E. rostratum</i>		1	1					1	1
	<i>Fusarium</i>	<i>F. redolens</i>					1	1		1	1
	<i>Fusarium</i>	<i>F. scirpi</i>		1	1					1	1
	<i>Penicillium</i>	<i>P. crocicola</i>		3	3			2	2	5	5
	<i>Penicillium</i>	<i>P. expansum</i>		1	1	1	2	3	1	3	4
	<i>Penicillium</i>	<i>P. glabrum</i>	1		1				1		1
	<i>Penicillium</i>	<i>P. jhanthinellum</i>					1	1		1	1
	<i>Penicillium</i>	<i>P. polonicum</i>	1		1	1		1	2		2
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium sp.</i>	1		1	1		1	2		2
	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>P. hawaiiensis</i>	1		1				1		1
	<i>Sordaria</i>	<i>S. fimicola</i>		1	1					1	1
	<i>Talaromyces</i>	<i>T. aurantiacus</i>		1	1					1	1
	<i>Talaromyces</i>	<i>T. galapagensis</i>				1		1	1		1
	<i>Talaromyces</i>	<i>T. minioluteus</i>						1	1	1	1
	<i>Talaromyces</i>	<i>T. pinophilus</i>		1	1					1	1
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. atroviride</i>		1	1					1	1
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. gamsii</i>					2	2		2	2
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. guizhouense</i>	1		1				1		1
	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma sp6</i>					1	1		1	1
	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma sp7</i>					1	1		1	1
	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma sp1</i>	1		1				1		1
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma sp2</i>		1	1					1	1	
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma sp3</i>		1	1					1	1	
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma sp4</i>					1	1		1	1	
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma sp5</i>				1		1	1		1	
<i>Trichoderma</i>	<i>T. virens</i>		1	1					1	1	
Basidiomycota	<i>Bjerkandera</i>	<i>B. adusta</i>		2	2				2	2	
	<i>Coprinellus</i>	<i>C. domesticus</i>		1	1		1	1	2	2	
	<i>Coprinellus</i>	<i>Coprinellus sp.</i>	1		1			1		1	
Zygomycota	<i>Rhizopus</i>	<i>R. oryzae</i>	1	1	2	1	1	2	2	4	
Total aislados			15	39	54	12	18	30	27	57	84
Diversidad de Simpson			1	0,9	0,97	0,984	0,97	0,9	0,952	0,9	0,94

Especies identificadas por género.

Arthrinium. De los tres aislados obtenidos de *Arthrinium*, dos de ellos se agruparon con *Arthrinium kogelbergense* (valor de soporte 69), por lo que fueron identificados como tal. Para la construcción del árbol se utilizaron secuencias concatenadas de las regiones ITS, *LSU* y *BenA* (Crous y Groenewald, 2013). El tercer aislado se agrupó pobremente con *Arthrinium xenocordella* (valor de soporte inferior a 50), lo que puede indicar la presencia de una cepa cercana filogenéticamente en la cual una o más de las regiones bajo estudio es particularmente más variable, por lo que fue identificado como *Arthrinium* sp. (Figura 2).

Morfológicamente ambos aislados presentaron un crecimiento similar en ADP, caracterizado por micelio aéreo blanquecino pálido con manchones anaranjados o pardos, colonizando la placa en menos de 7 días, lo que coincide parcialmente con las descripciones de las especies de *A. xenocordella* y *A. kogelbergense* en la literatura (Crous y Groenewald, 2013)

Si bien, *A. kogelbergense* fue reportando recientemente en China como agente causal de Tizón en bambú (Yin *et al*, 2021), su relación con la vid no está estudiada. Ambas especies fueron seleccionadas para las pruebas de competencia (Cuadro 6).

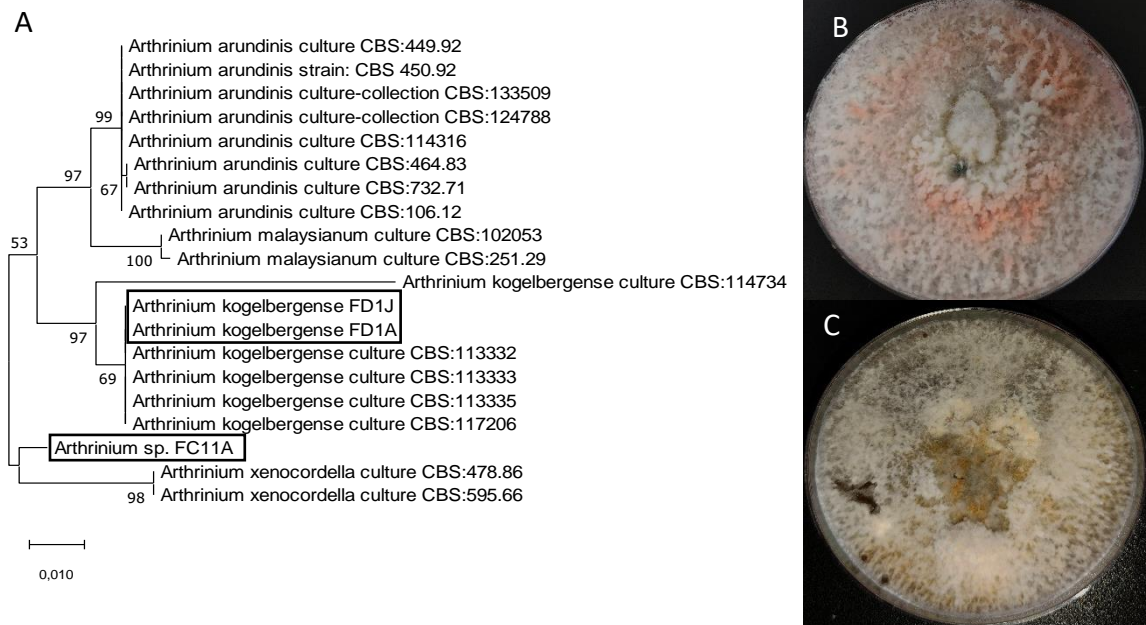
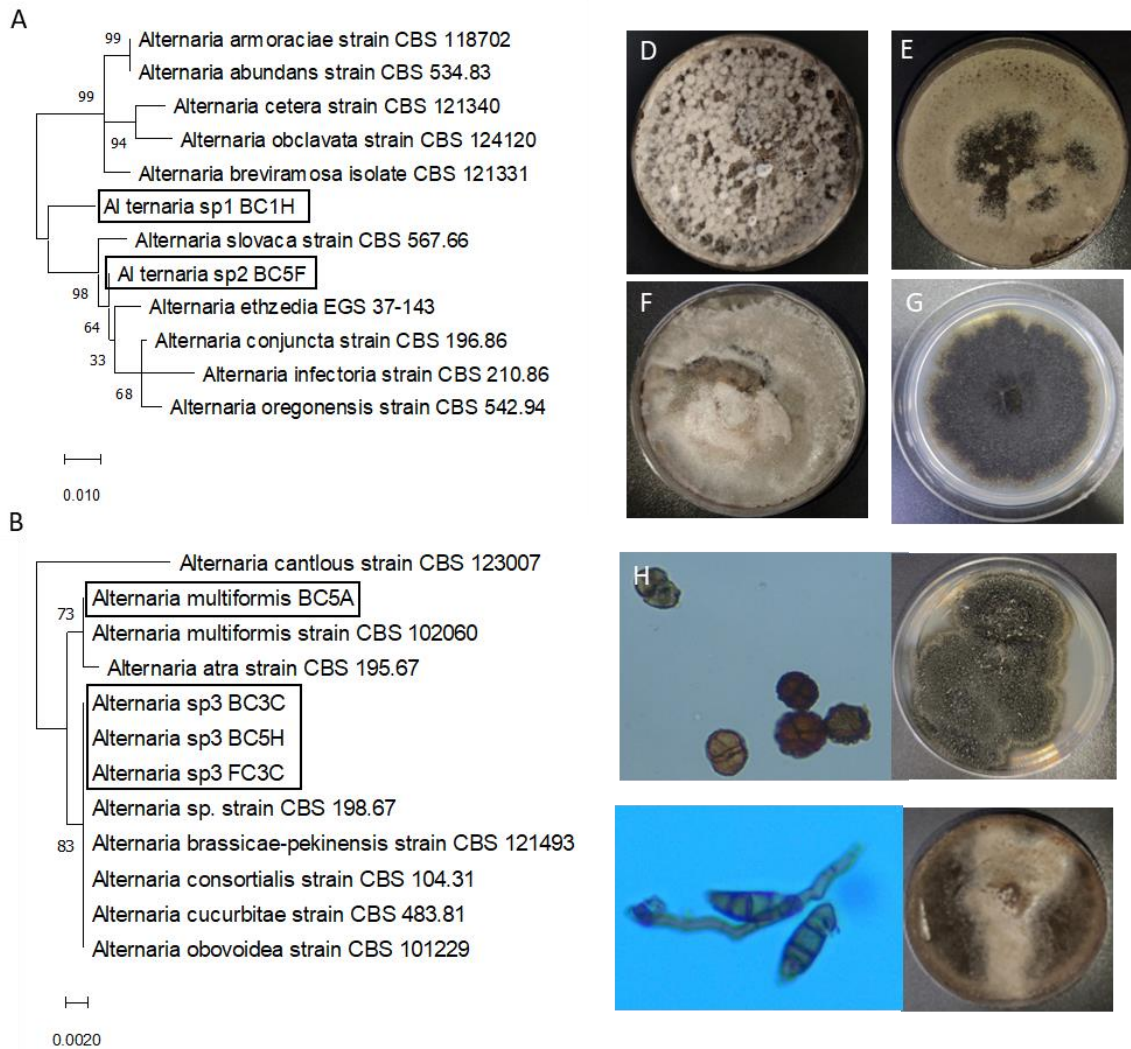


Figura 2. A: Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, *LSU* y *BenA* incluyendo 17 especies del género *Arthrinium* y a *Hypocrea gelatinosa* como outgroup. La reconstrucción filogenética se generó usando el protocolo Maximum likelihood, con bootstrapping de 1000 réplicas. El valor de Bootstrap sobre 50 es indicado en los nodos. **B:** Aislado de *Arthrinium kogelbergense*. **C:** Aislado de *Arthrinium* sp. FC1A, ambos en medio de crecimiento APD después de 14 en oscuridad continua a 22 °C.

Alternaria. Corresponde a uno de los géneros de Ascomycota con más especies reportadas en el mundo, su caracterización ha sido desarrollada, agrupando las especies en secciones, las que adicionalmente se agrupan en complejos de especies filogenéticamente relacionadas. Múltiples especies de *Alternaria* han sido reportadas en vides, algunas se clasifican como endófitas (Zhang *et al.*, 2019), otras participan activamente en varias pudriciones y pueden ocasionar manchas foliares (Torres, 2017).

Para un primer acercamiento a la taxonomía se concatenaron secuencias de la región ITS, *TEF1* y *GPDH*, desde las que solo se obtuvo de manera precisa la sección del género a la que pertenecen de acuerdo con la última revisión del género *Alternaria* (Woudenberg *et al.*, 2012). Catorce aislados se agruparon en Alternata, sección entre cuyos integrantes se encuentran *A. alternata*, *A. tenuissima* y el complejo de especies *A. arborecens*, entre otros, reportados comúnmente como patógenos de plantas infectando a vides, manzanos y pistachos, ocasionando manchas foliares en campo y pudriciones de postcosecha.



Continúa...

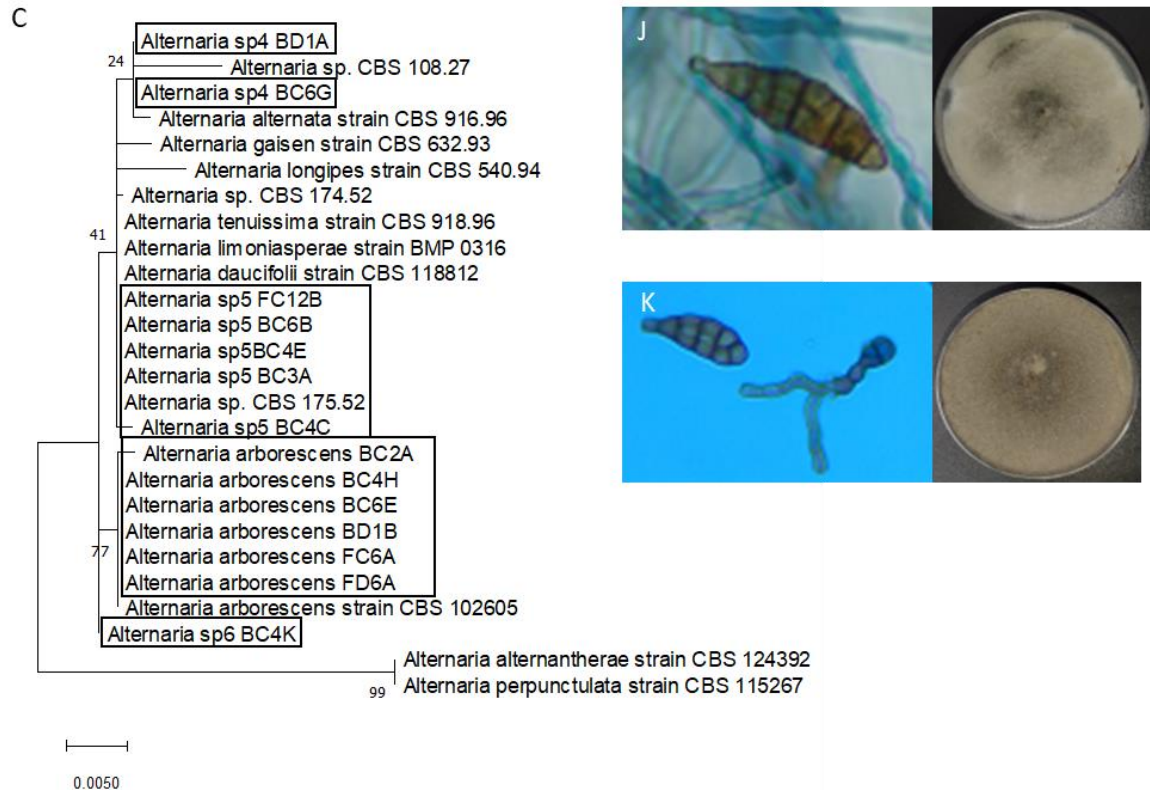


Figura 3. A-C: Árbol filogenético de las secciones Infectoriae, Ulocladioides y Alternata, respectivamente, elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, *TEF1* y *GPDH* incluyendo 71 especies de *Alternaria* y *Pleospora tarda* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. D-G: *Alternaria sp1* BC1H, *Alternaria sp6* BC4K, *Alternaria sp2* BC5Fy *Alternaria multiformis*, respectivamente, en medio APD. H-K: Detalle de conidias y crecimiento en medio APD de *Alternaria sp3*, *Alternaria sp4*, *Alternaria sp5* y *Alternaria arborescens*, respectivamente en medio de crecimiento APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

En análisis filogenéticos previos utilizando las regiones génicas ITS, *TEF1*, *GPDH* y *RPB2*, estas especies forman un clado monofilético separado de las demás secciones de *Alternaria*, sin embargo, se distingue pobremente entre especies dentro de la sección, debido a pocas diferencias en las secuencias de los genes estudiados (Pryor y Michailides, 2002; Hartevel, Akinsanmi y Drenth, 2012) (Figura 3).

Debido a lo anterior, 8 aislados fueron clasificados como 3 especies no definidas: *Alternaria sp4-6*, que se agruparon separadamente dentro del clado de la sección Alternata y seis aislados como *Alternaria arborescens* con un valor de soporte robusto (valor de soporte 77, Figura 3). Por otro lado, cuatro aislados se agruparon en dos clados dentro de la sección Ulocladioides, tres de ellos dentro de un complejo de especies entre las que se encuentran algunas descritas como patógenos de melón, col china y pepino (Woudenberg *et al.*, 2013), aunque sin un alto valor de soporte que permita identificarlas directamente, por lo que se

denominaron *Alternaria sp3*. El último aislado se agrupó con *Alternaria multiformis* (valor de soporte 77), evidenciando una separación de *Alternaria atra*, conocido como patógeno de plantas como las Solanáceas, y por el potencial control biológico sobre *B. cinerea* (Ronseaux, Clément y Barka, 2013), por lo que fue identificado como *Alternaria multiformis* (Figura 3). Finalmente, dos aislados fueron agrupados en la sección Infectoriae, que se caracteriza por especies saprofitas posiblemente alergenas para humanos como *Alternaria infectoria*, la cual es endófita del trigo (Silva *et al.*, 2014). Uno de ellos agrupado entre *Alternaria slovacica* y *Alternaria ethzedia*, por otro lado, el segundo aislado se agrupó en el exterior del clado Infectoriae, ambos fueron identificados como *Alternaria sp2* y *Alternaria sp1* respectivamente.

Debido a la amplitud del género y a las descripciones disponibles (Woudenberg *et al.*, 2012) se pudo confirmar parcialmente las secciones, *Alternaria sp3* posee conidias pequeñas, septadas y ovoides con una base estrecha, la morfología de la colonia en APD era similar a *Alternaria multiformis*, presentando una apariencia pilosa de color oscuro con bordes definidos color grisáceo, lo que se condice con lo reportado para la sección Ulocladioides (Woudenberg *et al.*, 2012). Los aislados de la sección Alternata presentaban conidias elipsoides, agudizadas hacia el final, septadas con una ligera compresión entorno a la septa. Debido a la información colectada, este género no fue seleccionado para las pruebas de competencia.

***Pleosporaceae*.** Los géneros *Bipolaris* y *Exserohilum* pertenecen a la familia Pleosporaceae, y debido a la disponibilidad de referencias de secuencias de referencia con la nomenclatura más reciente, fueron estudiados en conjunto. En ambos géneros se analizaron secuencias de las regiones ITS, LSU, GPDH y BenA (Hernández-Restrepo *et al.*, 2018). Las especies de ambos géneros se agruparon en clados separados y los aislados fueron identificados como *Exserohilum rostratum* y *Bipolaris cynodontis*, respectivamente, apoyado por un robusto valor de soporte (66 y 100, respectivamente) (Figura 4).

En medio APD, ambas colonias presentaron un crecimiento piloso, grisáceo, con sectores de micelio algodonoso blanco o negro. En *E. rostratum* fue posible visualizar conidias elipsoides a subcilíndricas, rostradas, moderadamente curvas, de color pardo oliváceo claro, con la punta y el ápice delimitados por un septo (Figura 4), lo que se condice con las descripciones de la especie en la literatura (Manamgoda *et al.*, 2014; Hernández-Restrepo *et al.*, 2018).

E. rostratum y *B. cynodontis* son considerados patógenos “cross-kingdom” de plantas y humanos, por ejemplo, generando manchas foliares en pastos y otras Poaceae, con la capacidad, a su vez, de cambiar de huésped a humanos u otros animales, en donde producen micosis subcutáneas (Sharma *et al.*, 2014; Nath *et al.*, 2015).

Debido a la información colectada, ninguno de estos géneros fue seleccionado para las pruebas de competencia.

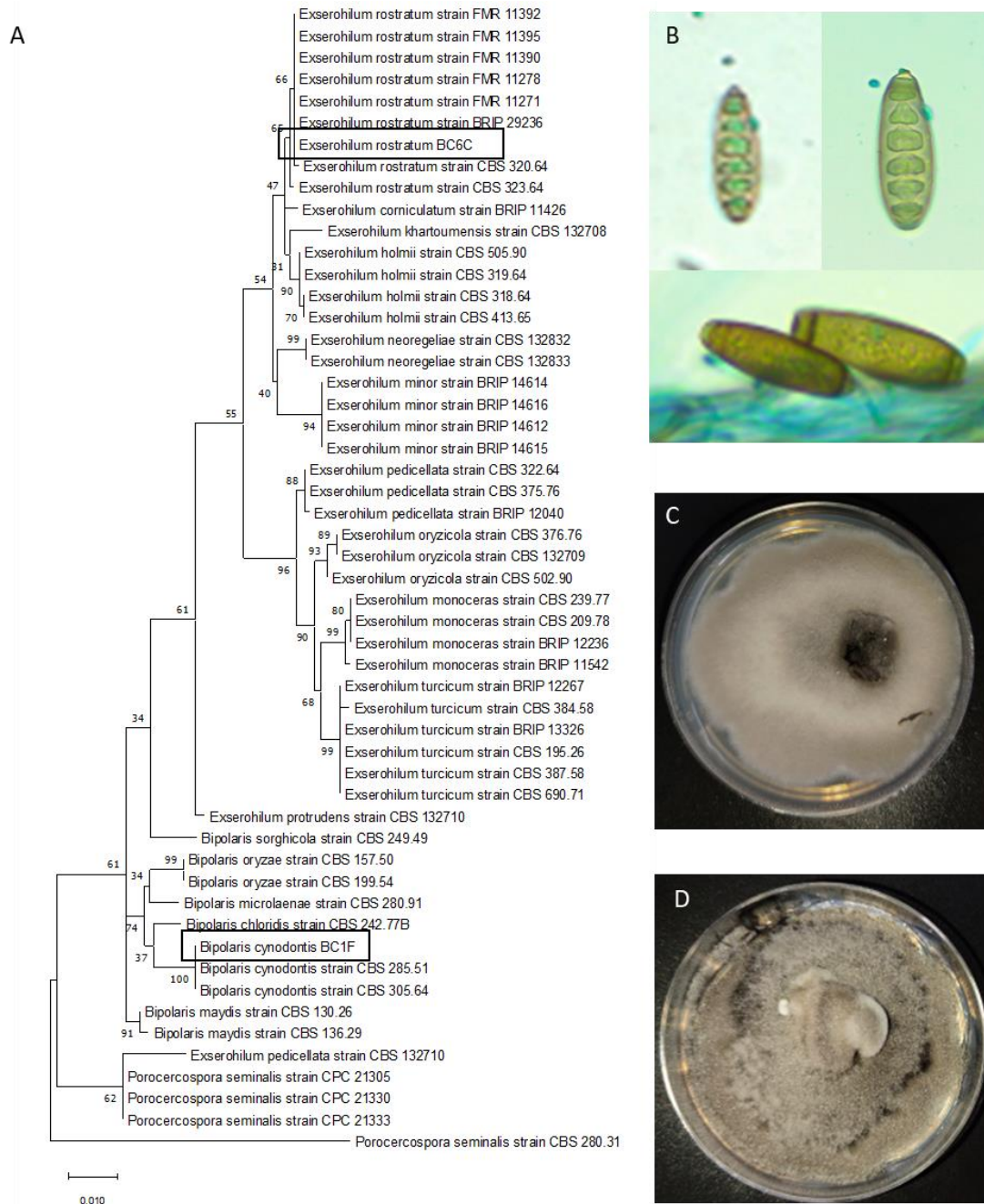


Figura 4. A. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes de las regiones ITS, LSU, GPDH y BenA de 19 especies de *Bipolaris* y *Exserohilum* con *Porocercospora seminalis* como outgroup. El árbol filogenético se construyó usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B:** Conidias de *Exserohilum rostratum*. **C:** *Exserohilum rostratum*. **D:** *Bipolaris cynodontis*. Ambos en medio de crecimiento APD después de 14 en oscuridad continua a 22 °C.

Fusarium. Corresponde a un género cosmopolita de hongos Ascomycota reportados como patógenos tanto de humanos como de plantas. La mayoría se encuentran como microorganismos de vida libre en el suelo y se caracterizan por tener conidias con forma de banana. De acuerdo con su reclasificación más reciente el análisis filogenético fue realizado utilizando secuencias concatenadas de las regiones ITS, *LSU* y *TEF1* (Crous *et al.*, 2021).

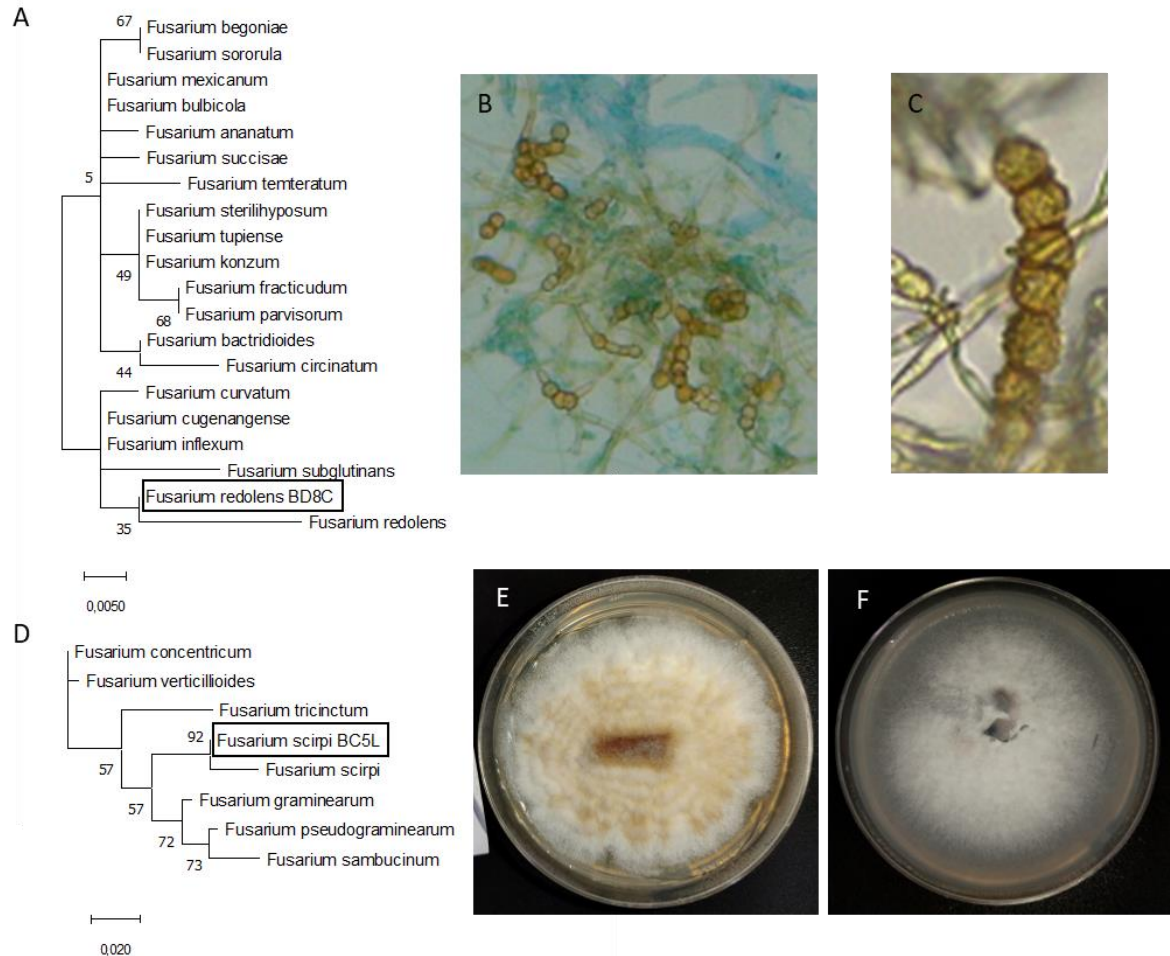


Figura 5. **A** y **D.** Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, *LSU* y *TEF1*, de 90 especies de *Fusarium* utilizando *Cyanonectria buxi* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B** y **C.** Clamidosporas de *Fusarium scirpi*. **E-F.** *Fusarium scirpi* y *Fusarium redolens*, respectivamente, en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

Se identificaron 2 especies (Figura 5), *Fusarium scirpi* con un alto valor de soporte (92) que corresponde a un hongo principalmente encontrado en restos de material vegetal muerto (Burgess *et al.*, 1985) y recientemente estudiado por la capacidad de algunas cepas de producir nanopartículas de plata con utilidad en el control de enfermedades bacterianas en

humanos (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2020). Por otro lado, se identificó con bajo soporte a *Fusarium redolens*, hongo reportado como fitopatógeno atacando guisantes, garbanzos, trigo y un amplio rango de hospederos con distintos niveles de patogenicidad causando lesiones y/o decoloraciones en raíces, corona y brotes (Esmaeili Taheri *et al.*, 2011). Adicionalmente, ha sido reportada como endófito de *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*, con potencial en la industria biomédica por su producción de alcaloides utilizados en la medicina oriental (Pan *et al.*, 2015).

En medio APD ambas colonias presentaron un crecimiento blanquecino pálido a hialino, con bordes que no alcanzaban la placa, en *F. scirpi* fue posible visualizar clamidosporas anaranjadas globosas a sub-globosas de color pardo anaranjado, las que les confieren el mismo color a secciones del micelio, y se conciden con la descripción original de la especie (Burgess *et al.*, 1985).

Debido a su condición de patógeno de plantas, ninguna especie de *Fusarium* fue seleccionada para las pruebas de competencia.

Epicoccum. Corresponde a un género de hongos endófitos ampliamente distribuido de Ascomycota, los que comúnmente se encuentran en el aire, suelo, plantas y agua. Su relación con las plantas puede ser de 3 tipos; endófitos, los que podrían ser potenciales ACB; patogénicos, los que le generaran una enfermedad a la planta; y saprófitos (Taguiam *et al.*, 2021). Para el caso de este grupo de aislados se utilizaron secuencias concatenadas de las regiones ITS, LSU y BenA (Chen *et al.*, 2017b). Las observaciones morfológicas sobre los aislados confirmaron el género, la presencia de conidias epicocoides, las que corresponden a fragmosporas multicelulares, sub-globosas a piriformes, de color pardo (Figura 6, B). Por otro lado, los aislados en medio APD presentaron tinción del medio y secreción de metabolitos secundarios (Figura 6, C-E).

Desde los seis aislados categorizados como *Epicoccum*, se identificaron dos especies (Figura 6, A). Un aislado corresponde a *Epicoccum layuense*, un hongo endófito estudiado como potencial ACB contra *Phaemoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium minimum* en vides (del Frari *et al.*, 2019), pero que en los últimos años se ha reportado en China como patógeno de plantas causando manchas foliares (Chen *et al.*, 2020; Chen, Li y White, 2020).

Adicionalmente, cinco aislados fueron identificados como *Epicoccum italicum* agente causal de mancha foliar en feijoa (*Acca sellowiana*) (Chen *et al.*, 2017b). Se observaron diferencias morfológicas entre los dos aislados agrupados por separado con un valor de soporte de 65, lo que sugiere que podría tratarse de una nueva especie o cepa de *E. italicum* (Figura 6).

Ambas especies de *Epicoccum* fueron seleccionadas para las pruebas de competencia (Cuadro 6).

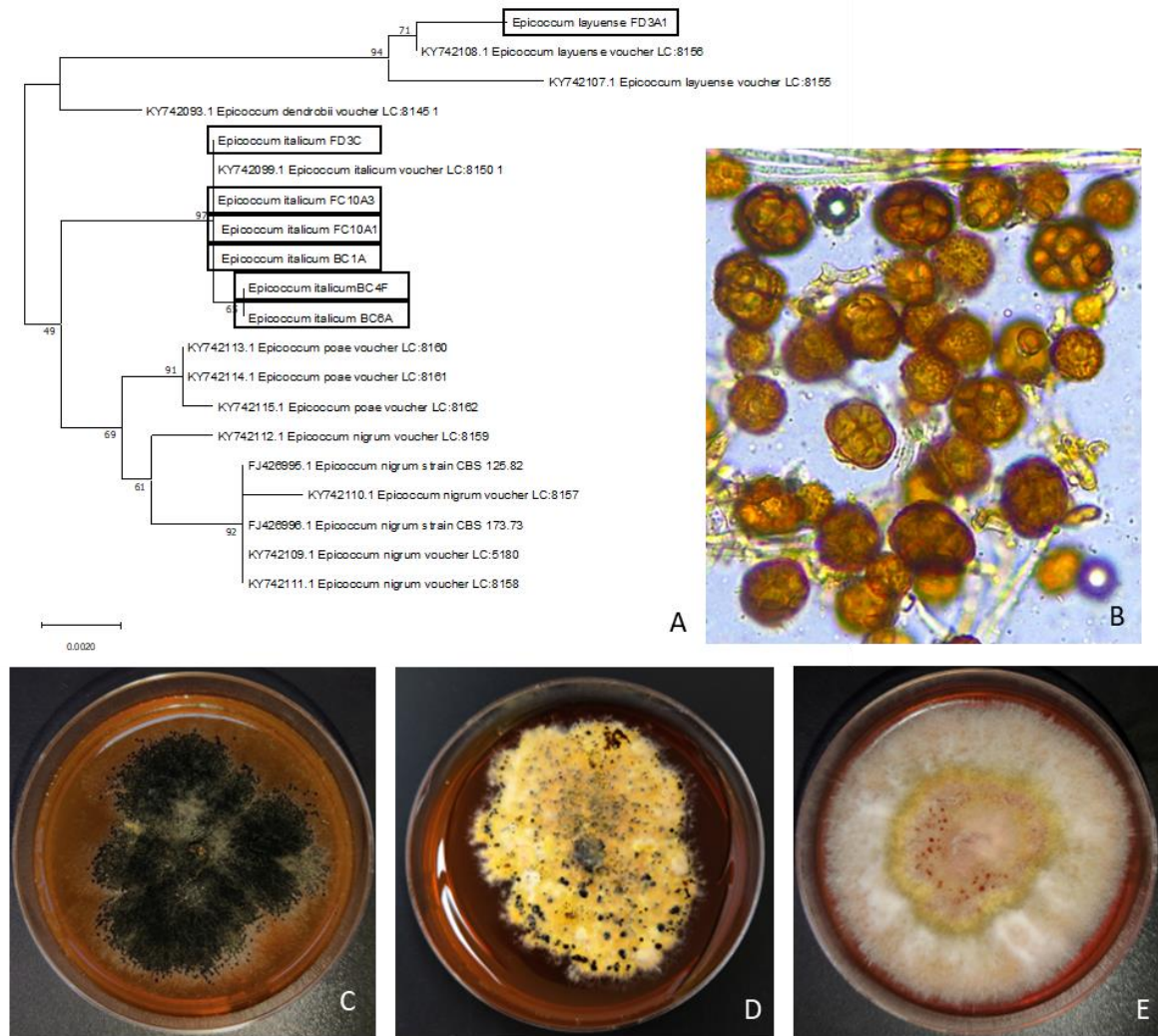


Figura 6. A: Secciones del árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, LSU y *BenA* de 17 especies de *Epicoccum* utilizando *Leptosphaeria doliolum* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B:** Conidias epicoccoides de *Epicoccum italicum*. **C-E:** *Epicoccum italicum* FD3C, *Epicoccum italicum* BC4F y *Epicoccum layuense*, respectivamente, en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

Sordaria. Morfológicamente, el género *Sordaria* se caracteriza por tener ascosporas de paredes delgadas, en peritecios de variados colores y por un rápido crecimiento (Cai, Jeewon y Hide, 2006). El aislado obtenido presentó peritecios de color negro y una tinción del medio de color grisáceo pálido. Para la identificación del aislado del género *Sordaria spp* se realizó un análisis filogenético de las secuencias de las regiones ITS, LSU y *BenA* (Cai, Jeewon y Hide, 2006) se encuentra ampliamente distribuido en el mundo produciendo su forma sexual en excrementos de herbívoros y como endófito de plantas (Newcombe *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se ha considerado como candidato ACB para “Dumping-off” en cereales causado por *Fusarium graminearum* con resultados prometedores (Er, 2020). *Sordaria fimicola* fue seleccionado para las pruebas de competencia (Cuadro 6).

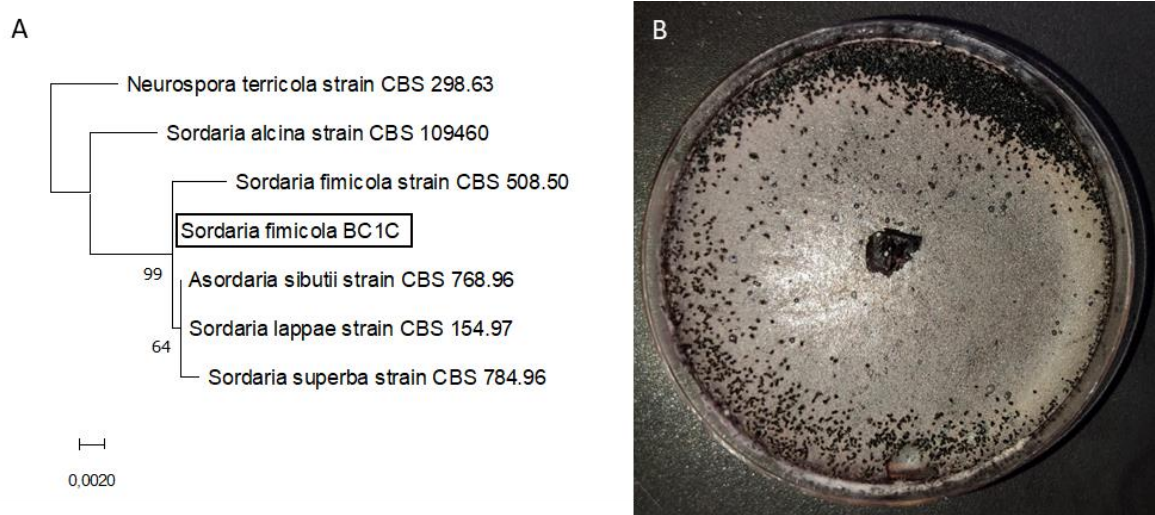


Figura 7. A. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, LSU y BenA de 32 especies de *Sordaria* utilizando *Lasiosphaeris hispida* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B:** *Sordaria fimicola* en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C

Chaetomium. El aislado clasificado en este género presentó peritecios negros visibles morfológicamente y micelio hialino creciendo a ras del medio confirmando la descripción en la literatura para el género (similar a *Sordaria*). Posteriormente, los resultados del análisis filogenético utilizando secuencias de las regiones ITS, LSU y BenA (Asgari y Zare, 2011) indicaron la presencia de *Chaetomium elatum*, un hongo ampliamente distribuido que genera relaciones simbióticas con paltos, siempre que las condiciones sean favorables, de lo contrario podría generar patogenicidad (Violi *et al.*, 2007).

Chaetomium elatum fue seleccionado para las pruebas de competencia (Cuadro 6).

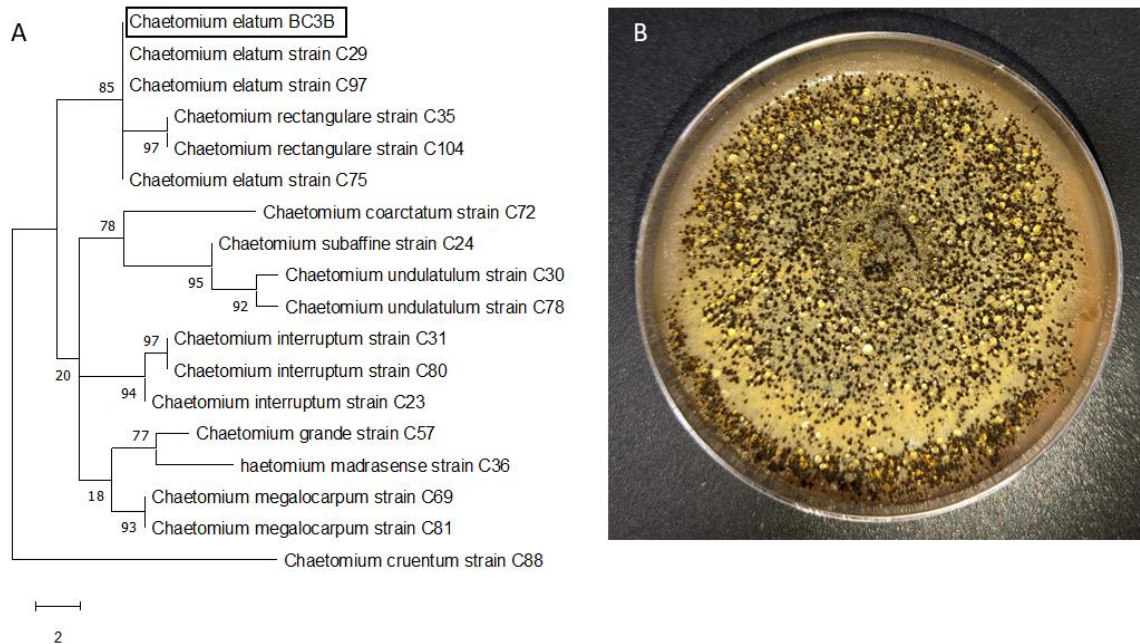


Figura 8. A: Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, *LSU* y *BenA* de 21 especies de *Chaetomium* y *Achaetomium strumarium* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B:** *Chaetomium elatum*, en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

Aspergillus. Corresponde a un género de hongos cosmopolitas, con un amplio rango de sustratos, aunque la mayoría de las especies son saprofitas. Varias de las especies tienen impactos económicos en humanos debido a que ocasionan enfermedades tanto en plantas de interés agrícola, produciendo pudriciones en vides y otras especies, como en humanos, produciendo aspergilosis.

El análisis filogenético fue realizado utilizando secuencias de la región ITS (Visagie y Houbraken, 2020). Los aislados se agruparon dentro de dos especies diferentes, mas no fue posible identificarlas, se espera que en análisis posteriores utilizando regiones génicas adicionales puedan ser identificadas a nivel de especie (Figura 9).

Las colonias presentaron una morfología similar entre sí en medio APD, con un micelio hialino a ras del medio, fuertemente esporulado con conidias negras. En *Aspergillus* sp. procedente de bayas se pudo observar sectores de micelio aéreo blanco-grisáceo, lo que es coherente con las descripciones realizadas en literatura (Samson *et al.*, 2014).

Las especies obtenidas del género *Aspergillus* no fueron seleccionadas para las pruebas de competencia.

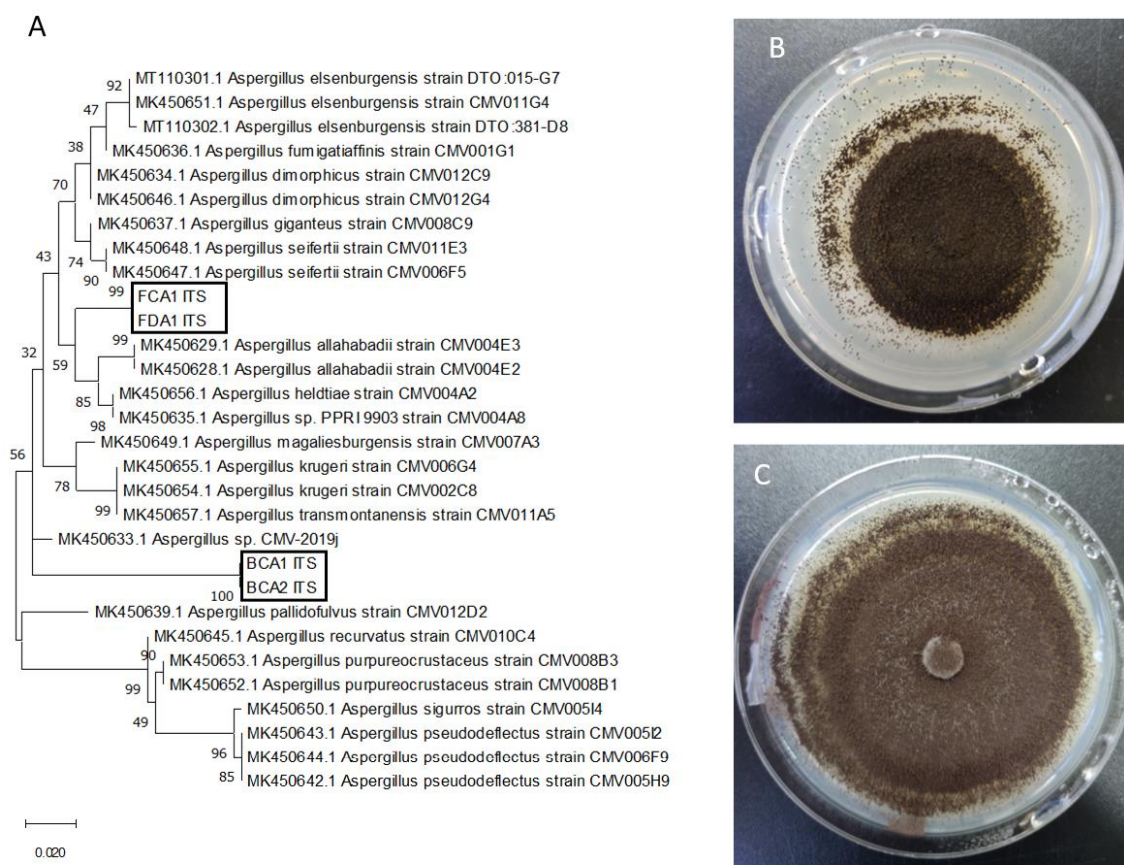


Figura 9. A: Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de la región génica ITS, de especies de *Aspergillus* y *Aspergillus palidotulvus* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B-C:** *Aspergillus* sp. encontrado en flores y bayas respectivamente, en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

***Penicillium*.** Este género contiene 354 especies definidas hasta 2014 (Visagie *et al.*, 2014). Es uno de los hongos más comunes teniendo diversos hábitats, entre ellos, el suelo, la vegetación, aire interior y exterior, así como productos alimenticios. Algunas especies causan pudriciones devastadoras tanto en pre como en post cosecha en variadas especies vegetales cultivadas (Visagie *et al.*, 2014). En vides y debido a la diversidad de especies del género que son patógenicas, está establecido *Penicillium* spp. como agente causal de enfermedades como la pudrición del racimo y la pudrición ácida (Acuña *et al.*, 2010).

Recientemente se ha reconocido a miembros dentro de este género con cualidades agrónomicamente atractivas, como inductores de crecimiento, los que potencialmente pueden ser desarrollados como biofertilizantes (Hyde *et al.*, 2019).

Los aislados de *Penicillium* colectados presentaron estípites septados, conidióforos con múltiples niveles de ramificaciones. En medio APD las colonias tenían aspecto de polvillo con colores entre verde pálido a verdeazulado o blanco a blanco grisáceo para el caso de

Penicillium jhanthinellum y con presencia de micelio aéreo en *Penicillium* sp., lo que coincide con las descripciones morfológicas del género (Visage *et al.*, 2014) (Figura 10). Para un acercamiento filogenético inicial se realizó un análisis utilizando secuencias concatenadas de las regiones ITS, *BenA* y *CaM* (Houbraken *et al.*, 2014; Visage *et al.*, 2014) identificándose 15 aislados en 6 especies: *Penicillium glabrum*, hongo comúnmente contaminante de comida que actualmente se estudia por el interés en producir enzimas xylanolíticas (Knob *et al.*, 2013); *Penicillium crocicola*, reportado en vides en Irán (Houbraken *et al.*, 2014); *Penicillium polonicum* y *Penicillium expansum*, ambos encontrados en bayas de uva vinífera en Eslovaquia (Santini *et al.*, 2014); *Penicillium jhanthinellum*, algunos aislados pueden reducir la toxicidad por cadmio (Khan *et al.*, 2013). Finalmente, dos aislados provenientes de flores en ambos predios, no fueron agrupadas en un clado con suficiente soporte, por lo que se identificaron como *Penicillium* sp., las especies filogenéticamente cercanas a estos aislados, como *Penicillium hordei*, son atractivas para la industria biotecnológica por su producción de metabolitos (Overy y Blunt, 2004) (Figura 11). Existe una predominancia de aislados de *P. crocicola* en las bayas de la región Metropolitana y de *P. expansum* en las bayas de la región de O'Higgins. Ninguna especie del género *Penicillium* fue seleccionada para las pruebas de competencia.

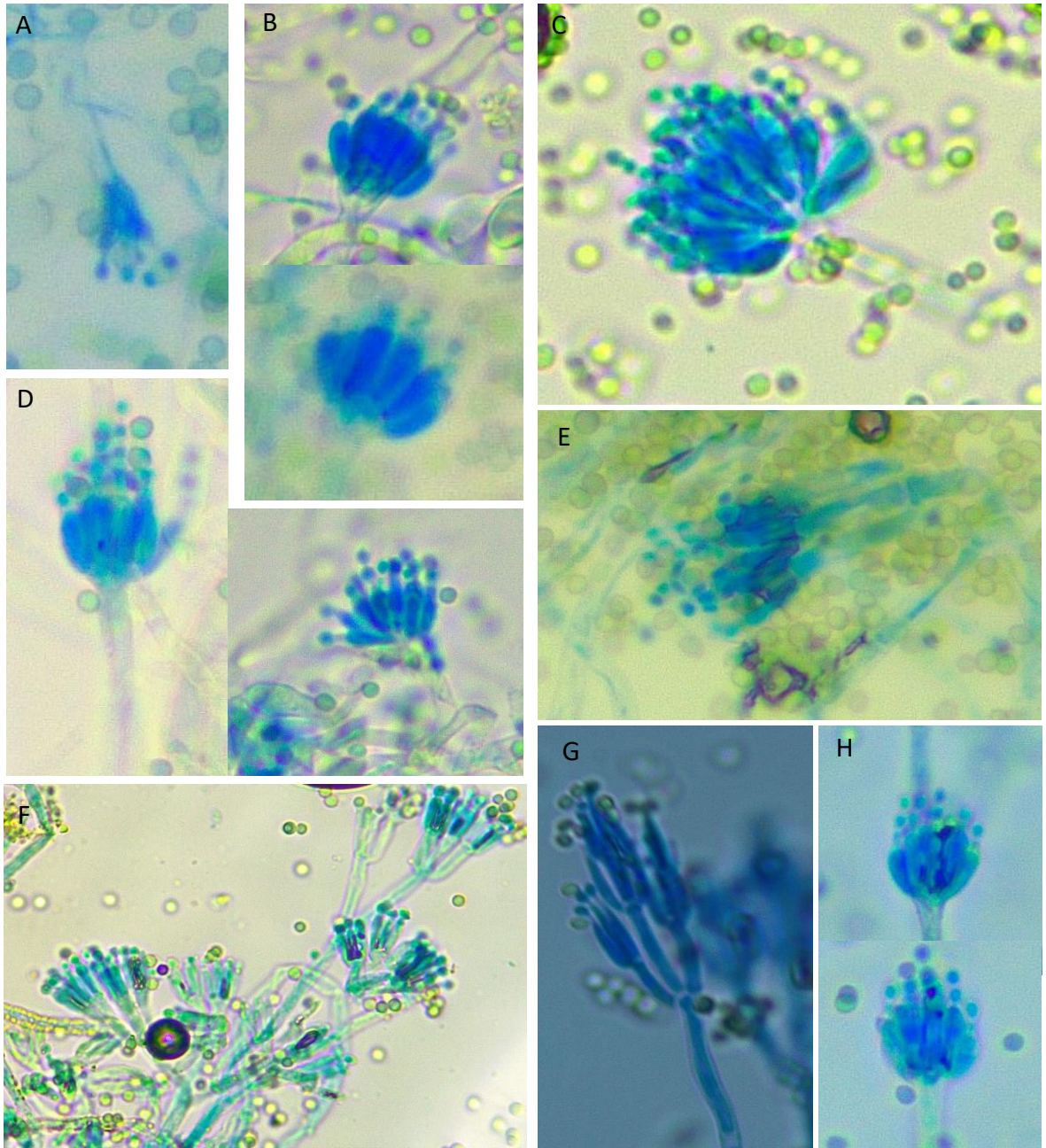


Figura 10. Conidioforos de las especies de *Penicillium* colectadas en este estudio. **A-C.** Conidióforos monoverticilados correspondientes a *P. crocicola*. **D.** *P. expansum* y **H.** *P. glabrum*. **E.** conidioforo tetraverticilado correspondiente a *P. crocicola*. **F.** Conidioforos biverticilados correspondientes a *Penicillium* sp. y **G.** Conidioforos quaterverticilados correspondientes a *P. expansum*.

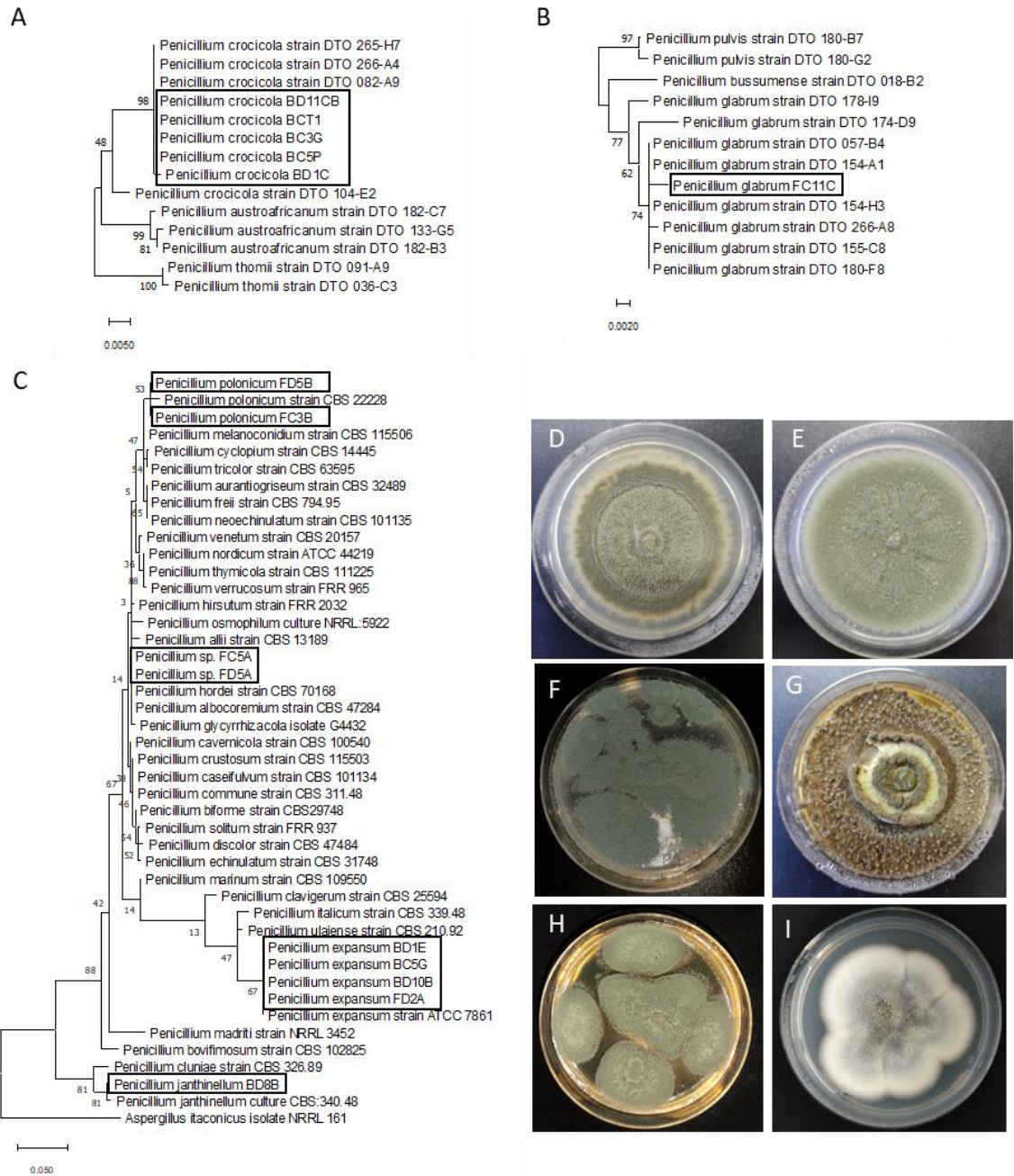


Figura 11. Árboles filogenéticos elaborados con secuencias concatenadas de los genes ITS, *CaM* y *BenA* de **A**, **B**. 15 especies de la sección Aspergilli y *P. expansum* como outgroup **C**. 35 especies de *Penicillium* con *Aspergillus itaconicus* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **D-I**: Placas con colonias de las especies de *Penicillium* colectadas en este estudio en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C. **D**: *P. crocicola*, **E**: *P. glabrum*, **F**: *P. polonicum*, **G**: *Penicillium* sp., **H**: *P. expansum*, **I**: *P. janthinellum*.

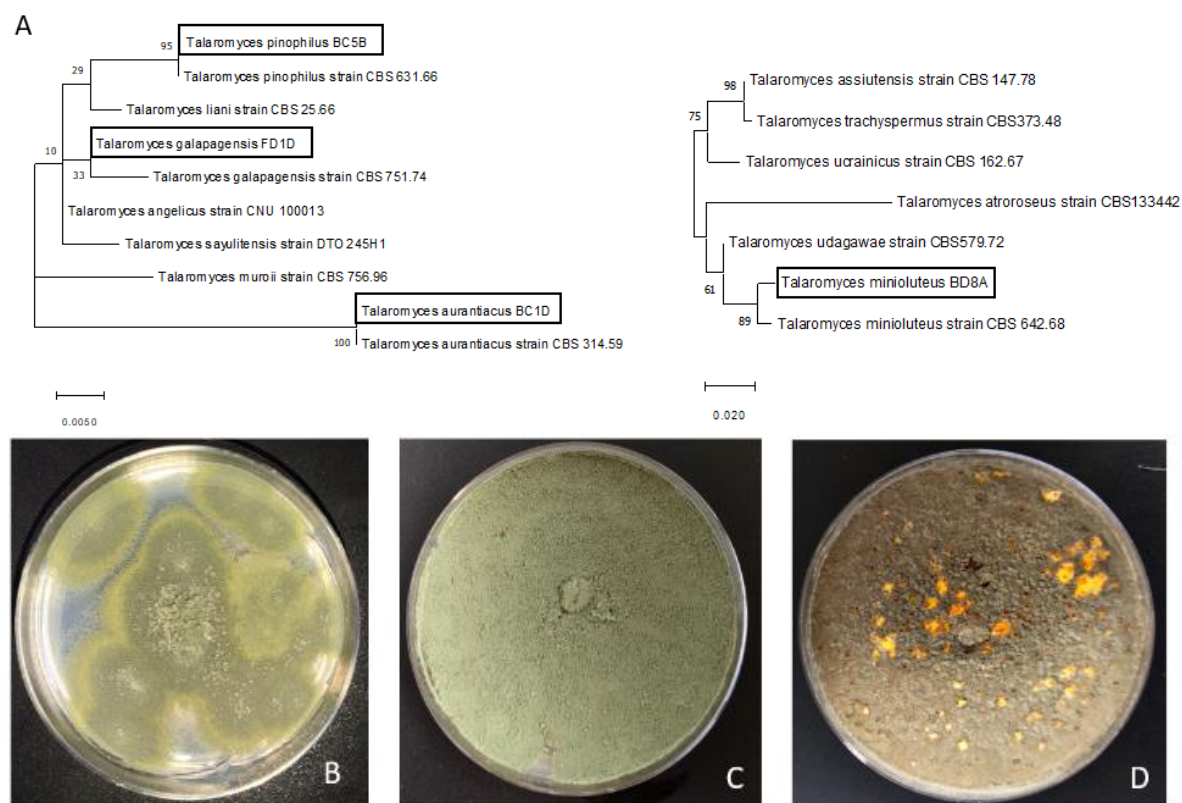


Figura 12. A: Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS y *BenA* de 88 especies de *Talaromyces* y *Trichocomma paradoxa* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B-D:** *Talaromyces pinophilus*, *Talaromyces aurantiacus* y *Talaromyces minioluteus*, respectivamente, en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

Talaromyces. Para el análisis filogenético de este género se utilizaron secuencias concatenadas de las regiones ITS y *BenA* (Yilmaz *et al.*, 2014). Sus características morfológicas no permitieron la distinción con aislados pertenecientes a *Penicillium*, apreciándose un micelio con un crecimiento a ras de placa, aterciopelado y de color verde en diferentes tonalidades. La tinción del medio APD durante su crecimiento sugirió la producción de metabolitos secundarios por parte de estos aislados (Figura 12).

Se identificaron 3 especies con un alto valor de soporte: *Talaromyces aurantiacus* (100), *Talaromyces pinophilus* (93), el cual ha mostrado actividad antagonista contra *B. cinerea* y efectos promotores de crecimiento en plantas de arroz (Sun *et al.*, 2020), y *Talaromyces minioluteus* (89), hongo que ha sido encontrado en diferentes frutas y vegetales que recientemente ha sido reportado como patógeno de postcosecha sobre frutas comerciales en Serbia (Stošić *et al.*, 2020).

Un cuarto aislado se agrupó con *T. galapagensis* pero debido a un valor de soporte de 33, no fue posible identificar con precisión su pertenencia a una especie determinada. Esto podría

indicar la presencia de una especie cercana a *T. galapagensis* o que corresponde a una cepa distinta del mismo hongo.

Solo *Talaromyces pinophilus* fue seleccionado para las pruebas de competencia (Cuadro 6).

Cladosporium. De acuerdo con la literatura, es un género de hongos comúnmente presente en plantas, de vida libre en el suelo, aire, comida y otros materiales orgánicos de gran interés para la industria biotecnológica por su capacidad de producir metabolitos secundarios (Salvatore *et al.*, 2021). Adicionalmente, pueden ser colonizadores secundarios en infecciones causadas por otros patógenos en plantas e hiper-parasitar otros hongos y morfológicamente se caracterizan por colonias aterciopeladas, pequeñas conidias concatenadas, limiformes a ovaladas (Bensch *et al.*, 2012). Para el análisis filogenético se utilizaron secuencias concatenadas de las regiones ITS y TEF (Bensch *et al.*, 2012; Bensch *et al.*, 2018), Los aislados obtenidos presentaron coherencia con la descripción morfológica del género observándose en APD colonias aterciopeladas, pardas de bordes oscuros con conidias concatenadas y limiformes (Figura 13).

El análisis filogenético permitió identificar a *Cladosporium arthropodii* y *Cladosporium australiense*, el tercer aislado no fue agrupado con otras secuencias alcanzando un soporte individual de 66, indicando la presencia de una nueva especie de *Cladosporium* o una cepa filogenéticamente divergente.

C. arthropodii fue descrito en 2006, reportado en Nueva Zelanda sobre hojas de *Arthropodium cirratum* causando lesiones en conjunto con *Alternaria* spp. (Braun, Hill y Schubert, 2006).

C. australiense fue aislada sobre *Eucalyptus moluccana* en Australia (Bensch *et al.*, 2010).

En vides chilenas es común ver reportes de *C. herbarum* como la principal especie identificada de *Cladosporium* (Acuña, 2010), sin embargo, en este estudio no fue posible aislar esta especie, adicionalmente, la literatura clasifica a *C. herbarum* dentro de un complejo de especies con el mismo nombre (Bensch *et al.*, 2012), lo que podría indicar que las especies reportadas en Chile podrían corresponder a otras especies relacionadas a *C. herbarum*.

Ninguna especie del género *Cladosporium* fue seleccionada para las pruebas de competencia.

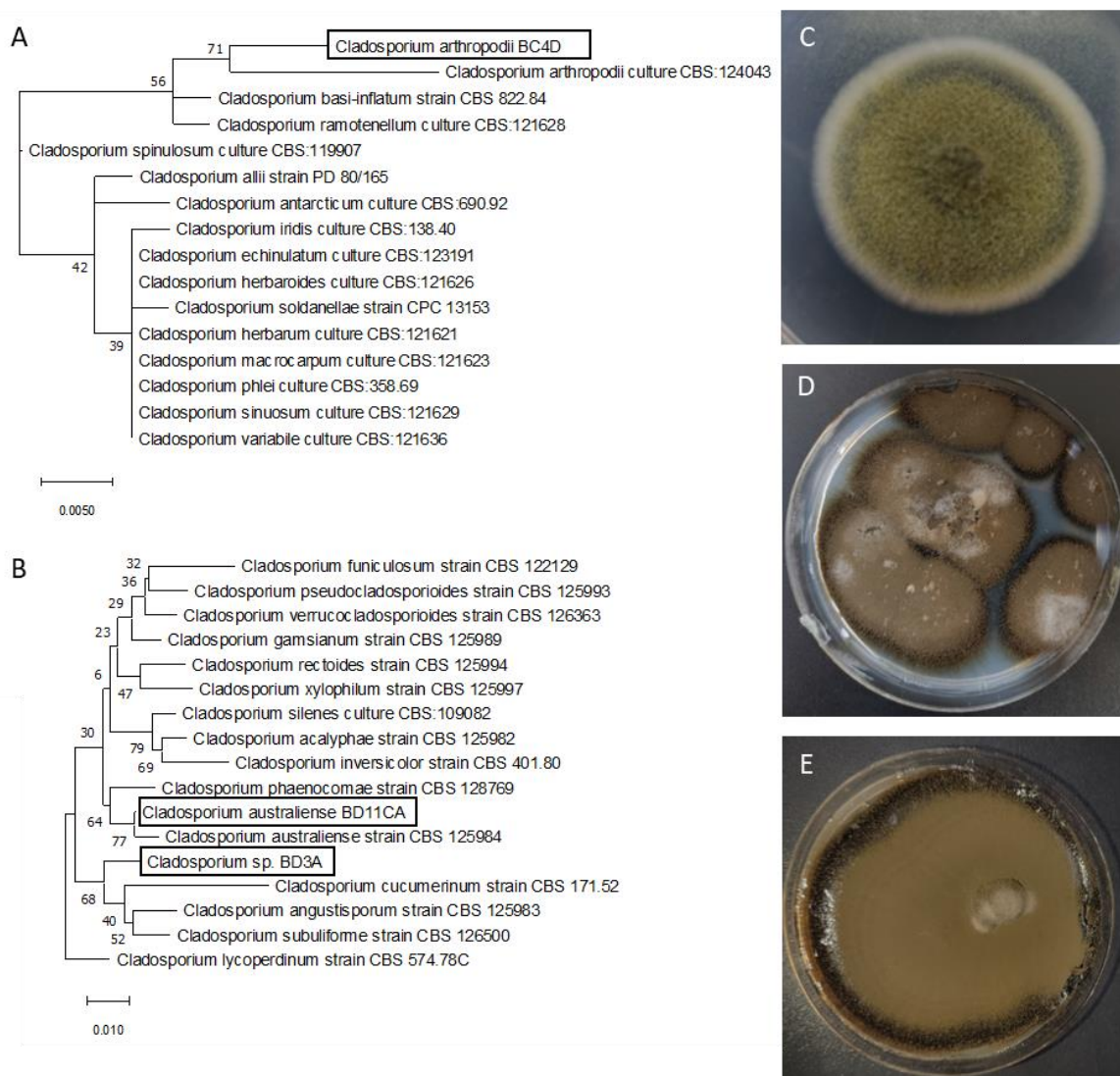


Figura 13. A y B: Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS y *TEF* de 69 especies de *Cladosporium* con *Cladosporium salinae* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B-E:** *Cladosporium australiense*, *Cladosporium* sp. y *Cladosporium arthropodii*, respectivamente, en medio ADP. **F-G:** conidias de *Cladosporium arthropodii*. en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

Diplodia. Para el análisis filogenético de este género se utilizaron secuencias de la región ITS obtenidas de la literatura. Se identificó al aislado como *Diplodia seriata*. Morfológicamente presentó un micelio aéreo algodonoso y un color grisáceo, lo que coincide con las descripciones de *Diplodia* (Yang *et al.*, 2017) (Figura 14).

Diplodia seriata, en conjunto con otros hongos de la familia *Botryosphaeraceae* causan la enfermedad en la madera de vides descrita como “*Botryosphaeria dieback*” (Güngör y Yildiz, 2021), por lo que no fue seleccionada para las pruebas de competencia.

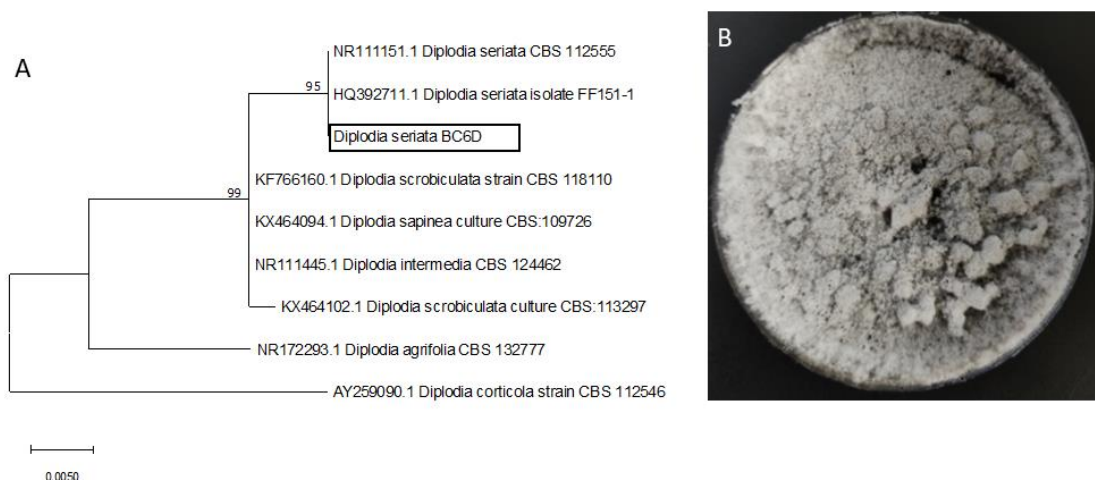


Figura 14. A: Árbol filogenético elaborado con secuencias de la región ITS de 6 especies de *Diplodia* y *Diplodia corticola* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B:** *Diplodia seriata* en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

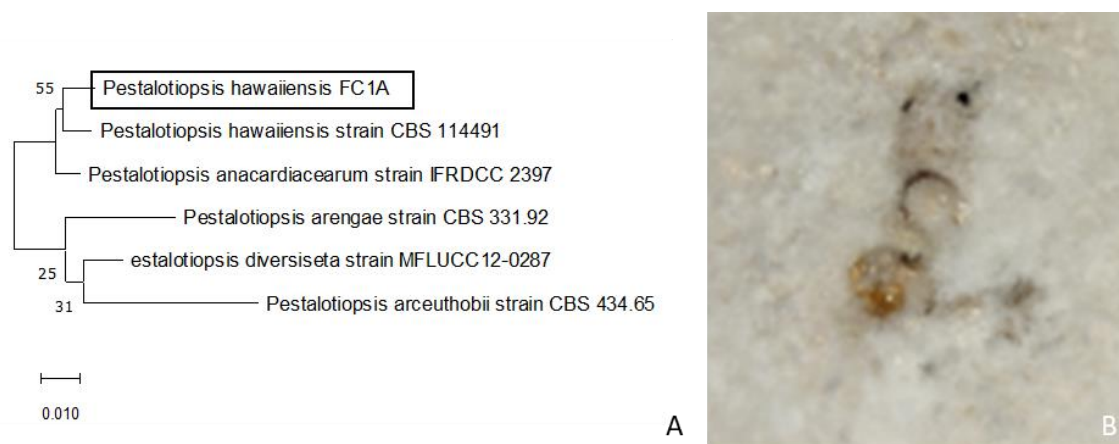


Figura 15. A: Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS y *TEF1* de 68 especies de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis saprophyta* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B:** Vista macroscópica de *P. hawaiiensis* en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C se observan conidiomatas globosos, negros y semi-inmersos, secreciones de metabolitos secundarios y micelio blanquecino.

Pestalotiopsis. El análisis filogenético fue realizado mediante la concatenación de secuencias de las regiones ITS y *TEF1*, incorporando las secuencias de la revisión más reciente del género (Maharachchikumbura *et al.*, 2014) y añadiendo secuencias de especies descritas posteriormente (Ariyawansa y Hyde, 2018). Se identificó al aislado como *Pestalotiopsis hawaiiensis* con un valor de soporte de 55 (Figura 15 A), debido a que la descripción de la especie es concordante con la morfología del hongo, observándose un micelio de color blanquecino y márgenes ondulados, con conidiomas negros, semi inmersos, globosos y solitarios (Figura 15, B).

Algunas especies de este género están descritas como hongos fitopatógenos causando pudriciones foliares y en frutos de *Syzygium samarangense*, *P. hawaiiensis* fue aislado desde *Leucospermum* sp. cv. ‘Coral’ en Hawaii, USA (Maharachchikumbura *et al.*, 2014). *Pestalotiopsis hawaiiensis* no fue seleccionado para las pruebas de competencia.

Trichoderma. Este género es uno de los más estudiados en micología, debido a sus múltiples beneficios en la industria agrícola y biotecnológica, ya que la mayoría de sus especies pueden hiper-parasitar a otros hongos y actuar como promotores de crecimiento en plantas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Druzhinina *et al.*, 2011). Hasta 2021 se encuentran 375 especies validadas (Cai y Druzhinina, 2021). Sin embargo, la identificación está limitada por las bases de datos con secuencias taxonómicamente actualizadas y validadas para cada una de las especies informadas. Para el análisis filogenético se utilizaron secuencias concatenadas de las regiones ITS, *RPB2* y *TEF1* (Zheng *et al.*, 2021).

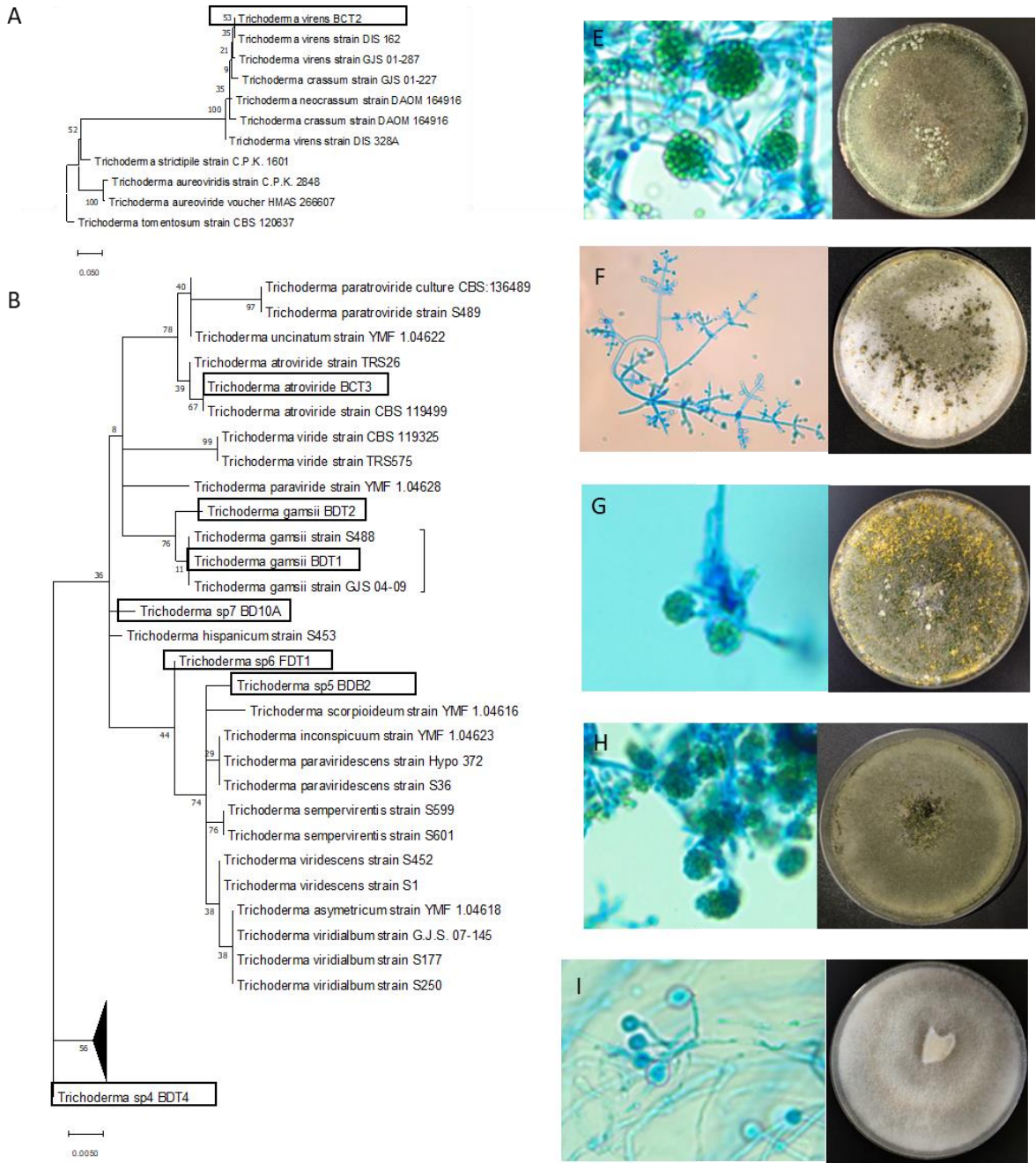
Morfológicamente las colonias de los aislados obtenidos en APD fueron similares, presentando conidióforos con fiálides lanceoladas dispuestas en forma de pino, con conidias de color verde, globosas y lisas. La mayoría de los aislados colonizó el medio en menos de 7 días a 22°C, las colonias en placas poseían un micelio fibroso, blanco hialino o verde, con sectores flocoso verdes a amarillos. Se destacó el cambio de la coloración del medio ADP durante el crecimiento de los aislados, sugiriendo la presencia de metabolitos secundarios. Particularmente, se observó una tinción de color negro y dorado en *Trichoderma gamsii* (Figura 16).

Dentro de las especies identificadas se encuentran; *Trichoderma virens*, especie que ha sido formulada comercialmente como un biofungicida, y ha sido encontrada en Estados Unidos, Canadá y México tanto en agroecosistemas como en ecosistemas no intervenidos (Sanchez *et al.*, 2012); *Trichoderma atroviride*, un muy estudiado agente de biocontrol (Zeilinger y Gruber, 2014), *Trichoderma gamsii*, hongo endófito de lentejas, promotor de crecimiento y ACB (Rinu, Sati y Pandey, 2013); y *Trichoderma guizhouense*, especie críptica del clado Harzianum, que presenta alta actividad de micoparasitismo y se ha estudiado por su capacidad como promotor del crecimiento en plantas (Xu *et al.*, 2020).

Adicionalmente, se clasificaron 5 aislados como *Trichoderma sp1-5*, al no poder ser clasificados. A diferencia de lo descrito para *Alternaria*, los aislados no identificados de *Trichoderma* no se agruparon en un clado o con más especies, por lo que se presume de que se trata de nuevas especies, o especies que no estaban consideradas en la base de datos utilizada para el análisis filogenético (Figura 16).

Dos aislados presentaron politomía filogenética, por lo que fueron identificados como *Trichoderma sp6* y *Trichoderma sp7*.

Todos los aislados del género *Trichoderma* fueron seleccionados para las pruebas de competencia (Cuadro 6).



Continúa...

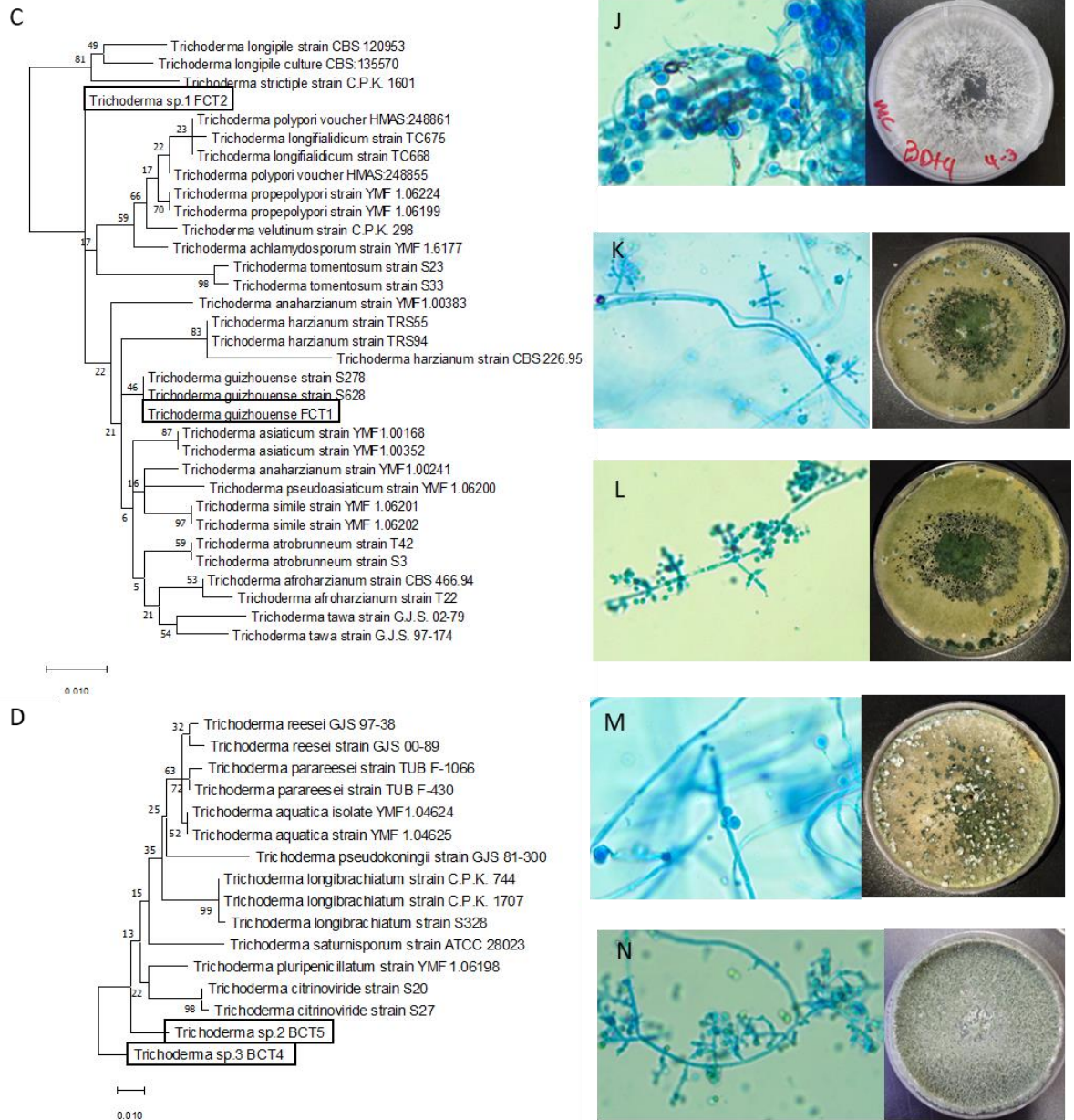


Figura 16. A-D: Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes *ITS*, *TEF* y *RPB2* de 63 especies de *Trichoderma* y *Protocrea farinosa* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **E-N:** Estructuras reproductivas y crecimiento en medio APD de **E:** *Trichoderma virens*. **F:** *Trichoderma atroviride*. **G:** *Trichoderma gamsii*. **H:** *Trichoderma* sp.5. **I:** *Trichoderma* sp.6. **J:** *Trichoderma* sp.4. **K:** *Trichoderma* sp.1. **L:** *Trichoderma guizhouense*. **M:** *Trichoderma* sp.2. **N:** *Trichoderma* sp.3, respectivamente en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

Rhizopus. Los aislados de este grupo fueron los más agresivos en colonizar el medio, cubriendo rápidamente la placa (tiempo menor a 3 días). Los aislados fueron recuperados tanto desde flores como de bayas, y en las dos localidades en estudio. Para el análisis filogenético se utilizaron secuencias de la región ITS disponibles en la literatura (Abe, Asano y Sone, 2010). Todos los aislados se identificaron como *Rhizopus oryzae*, hongo que se ha reportado participando de pudriciones de postcosecha (Ladaniya, 2008) y en micosis en humanos (Cabrera-Aguas, *et al.*, 2021) (Figura 17).

Usualmente, la especie de *Rhizopus* asociada a vides es *R. stolonifer* (Acuña, 2010), por lo que es curioso encontrar solo a *R. oryzae* en todos los campos y estadíos, siendo este primeramente reportado en Frutillas (Mujica y Vergara, 1980)

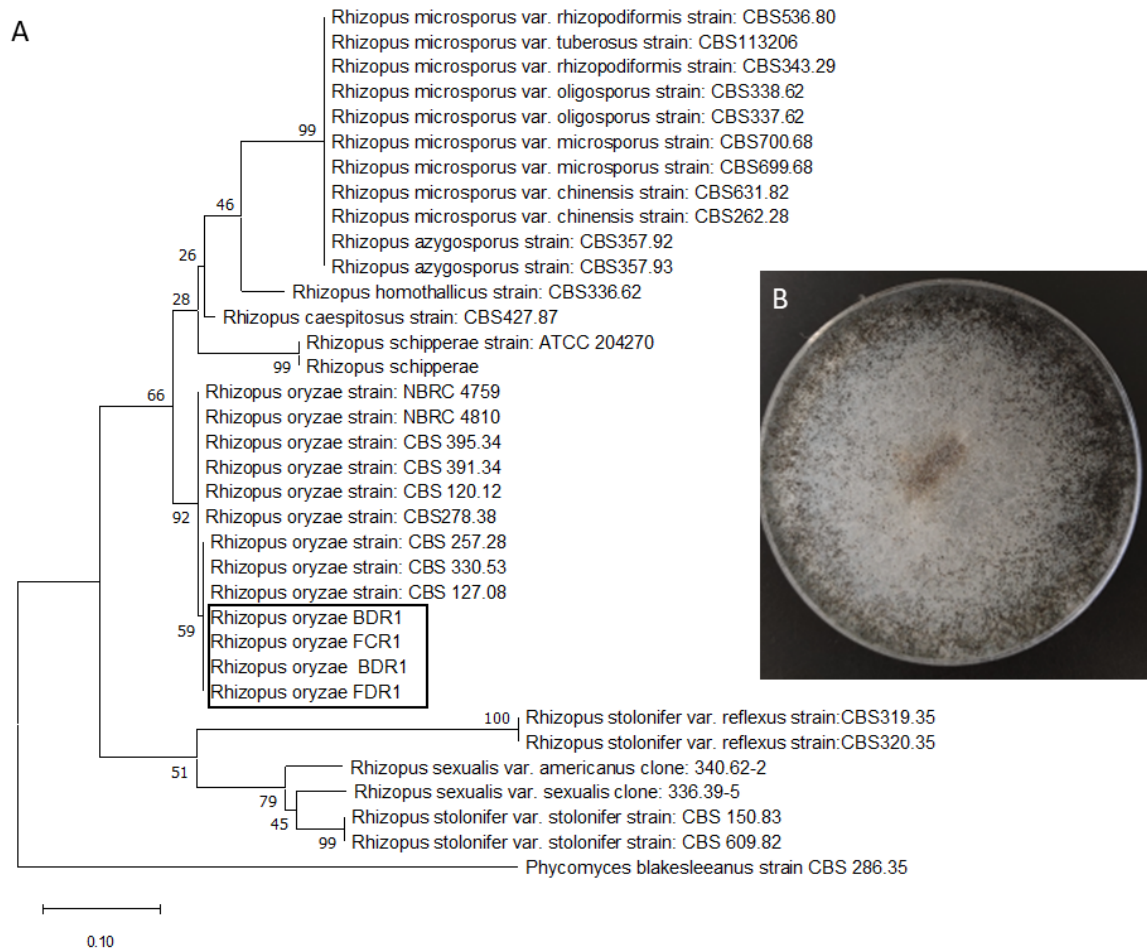


Figura 17. A: Árbol filogenético elaborado con secuencias de la región ITS de 11 especies de *Rhizopus* con *Phycomyces blakesleeanus* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B:** *Rhizopus oryzae* en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

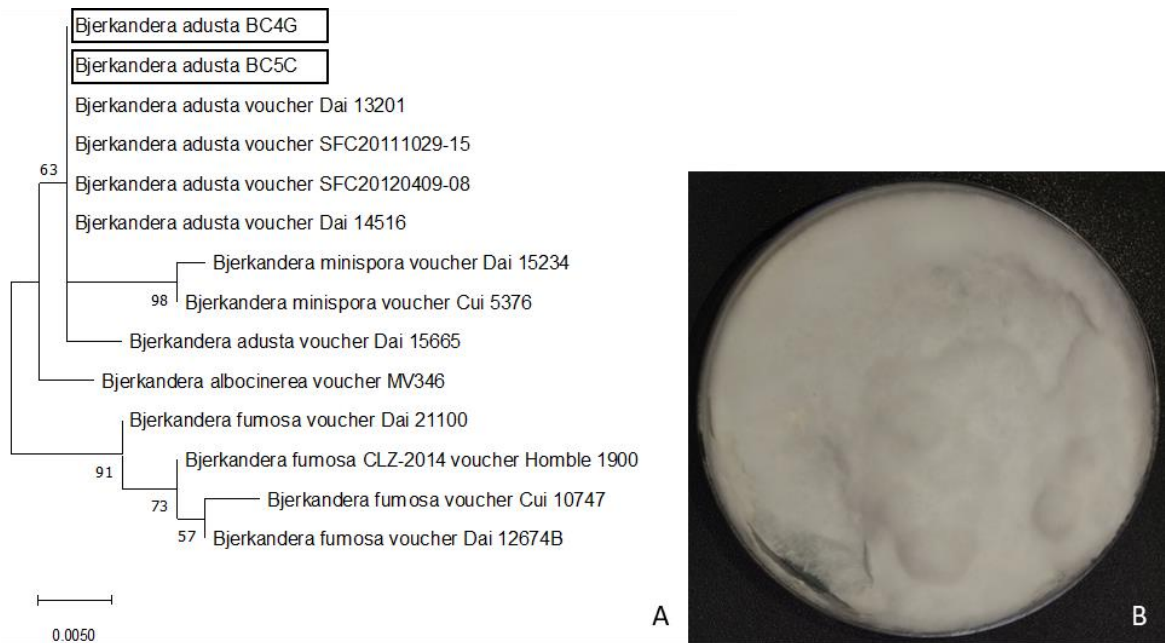


Figura 18. A: Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de las regiones génicas ITS y *LSU* de 9 especies de *Bjerkandera* y *Ceriporia viridans* fue utilizada como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B:** aislado de *Bjerkandera adusta* en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C.

***Bjerkandera*.** Para la identificación de este género se utilizaron secuencias de la región ITS y *LSU* (Wang *et al.*, 2021). La morfología del aislado no permitió establecer un género debido a la ausencia de estructuras reproductivas, el aspecto de la colonia en APD fue blanco, micelial y con crecimiento aéreo, colonizando la placa en su totalidad en menos de 14 días. Aunque con un menor soporte, se identificaron ambos aislados como *Bjerkandera adusta* (Figura 18).

Esta especie corresponde a un hongo Basidiomycota asociado a la madera reportado en Chile en frambuesos y kiwis ocasionando pudrición basal de cañas, raíces y muerte del brazo, respectivamente (Acuña, 2010). Además, tiene capacidades de biodegradación de tinturas (Heinfling, Bergbauer y Szewzyk, 1997) y bajo ciertos contextos conduce a una reacción alérgica en humanos y otros mamíferos (Liu *et al.*, 2014).

***Coprinellus*.** Corresponde a un género de hongos coprófagos que generalmente habitan sobre estiércol de animales, pertenecientes a Basidiomycota y al orden de los agaricales, caracterizados por producir basidiosporas oviformes con una abertura apical en basidiocarpos con la forma típica de una seta. Su caracterización filogenética se realizó a partir de secuencias de la región ITS (Nagy *et al.*, 2012).

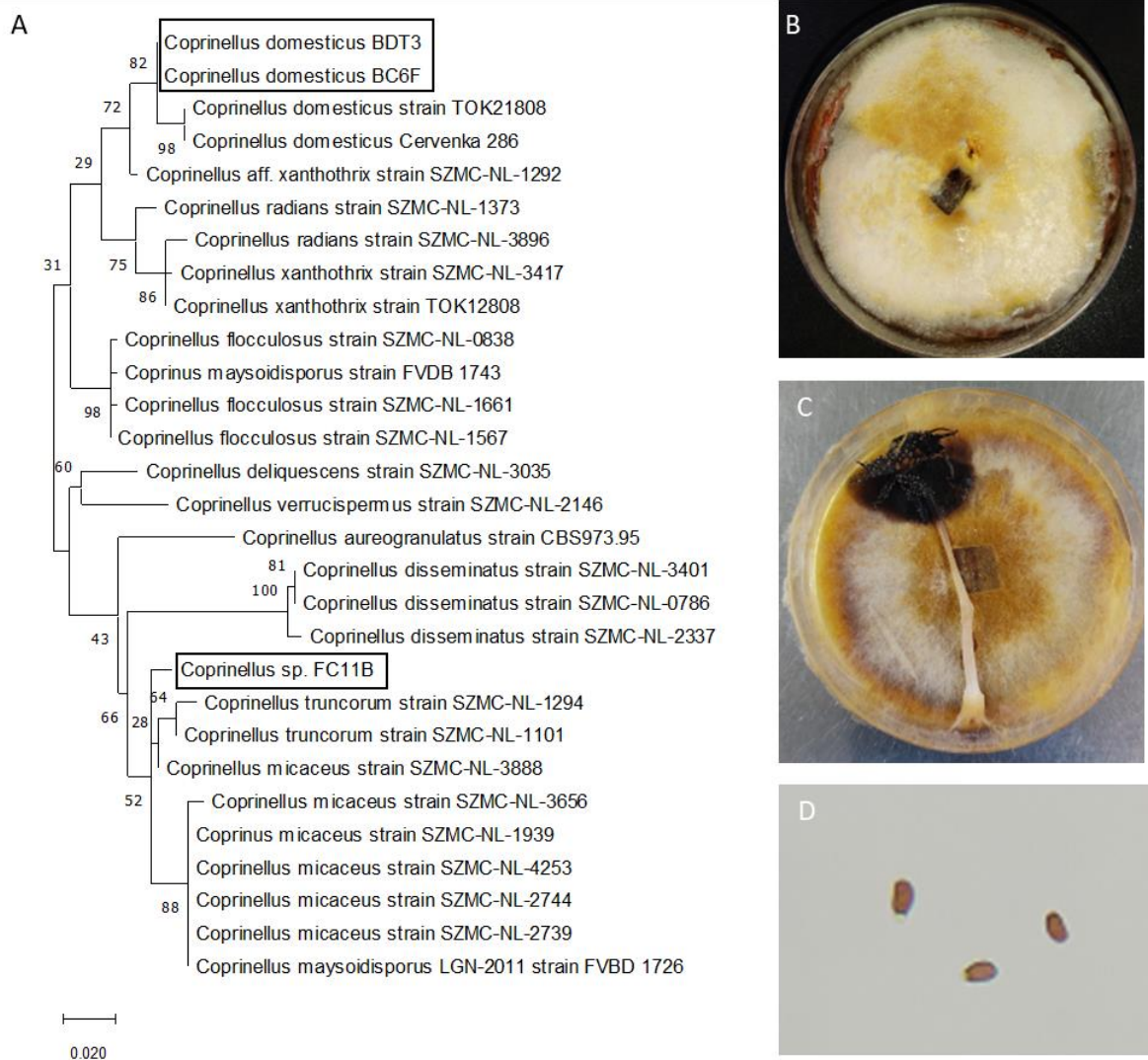


Figura 19. A: Árbol filogenético elaborado con secuencias de la región ITS de 66 especies de *Coprinellus* con *Psathyrella leucotephra* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. **B-C:** Diferentes fenotipos de *Coprinellus domesticus*, uno con restos de basidiocarpio, en medio APD después de 14 días en oscuridad continua a 22 °C. **D:** Basidiosporas de *Coprinellus domesticus*.

Se identificó a *Coprinellus domesticus* en bayas en ambas localidades. Interesantemente, la morfología de las colonias fue distinta entre sí, *C. domesticus* BC6F desarrolló un micelio de apariencia viscosa con márgenes medianamente definidos, mientras que el micelio de *C. domesticus* BDT3 fue piloso con hifas visibles. Este aislado fructificó en la placa, permitiendo observar basidioporas. El micelio desarrollado a partir de las basidiosporas

presentó una morfología diferente, siendo un micelio flocoso blanco, con poco micelio aéreo y de rápido crecimiento, por lo que fue rotulado como *C. domesticus* BDT3bs y considerado como un aislado diferente en la prueba de competencia (Figura 19).

Por otro lado, un tercer aislado fue identificado como *Coprinellus* sp. debido a su agrupación en un clado monofilético, lo que podría indicar la presencia de una nueva especie, la validación de esta hipótesis requiere la incorporación de uno o más genes “housekeeping” al análisis filogenético.

Coprinellus domesticus Bs, proveniente de basidiosporas y *Coprinellus domesticus* M, proveniente de micelio, ambos aislados de bayas, fueron seleccionados para la prueba de competencia (Cuadro 6).

La composición de la microbiota fúngica nos permite obtener un panorama (acotado a la temporada 2020-2021) de lo que ocurre durante el periodo productivo de la uva de mesa cv. Thompson Seedless. Las flores están acompañadas principalmente de *Arthrrium* spp. y *Epicoccum* spp. (Cros y Groenewald, 2013; del Frari *et al.*, 2019). como especies endófitas, que son patógenas en otras especies vegetales, así como *Alternaria* spp. y *Penicillium* spp. que son principalmente patógenas. Por otro lado, en bayas se evidencia un aumento de la diversidad y riqueza de especies considerable (Cuadro 4), donde se identificaron especies patógenas de madera como *Bjerkandera adusta* y *Diplodia seriata*, lo que posiblemente indica la presencia de plantas enfermas en el huerto. Adicionalmente, desde las bayas fue posible recuperar especies endófitas de *Fusarium* (Crous *et al.*, 2021), así como especies cuyo nicho no son las bayas como *Coprinellus domesticus* (Nagy *et al.*, 2012), e incluso *Chaetomium elatum*, saprofito de vida libre en el suelo (Violi *et al.*, 2007), dando a entender que las bayas de uva de mesa contribuyen a una parte del ciclo biológico de muchos hongos, los que pueden ser beneficiosos para la planta.

Al respecto de los hongos potencialmente patógenos, solo una especie de *Rhizopus* ha sido encontrada (*Rhizopus oryzae*) y previamente no estaba descrita (Acuña, 2010), por otro lado, las especies de *Aspergillus* fueron diferentes entre estadios fenológicos y se recuperaron especies patógenas “Cross Kingdom” capaces de infectar plantas y humanos; *Bipolaris cynodontis* y *Exserohilum rostratum* (Sharma *et al.*, 2014; Nath *et al.*, 2015), lo que debe considerarse para la inocuidad de los alimentos.

Evaluación de la capacidad de competencia.

La evaluación de la capacidad de competencia se realizó utilizando 26 aislados de los distintos géneros seleccionados, los que fueron sometidos a pruebas de crecimiento dual con aislados de *B. cinerea* resistente a fenhexamid, boscalid y sensible absoluto. Se midió el crecimiento radial de las colonias y se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial PICR (%) que ejercen los aislados sobre cada cepa de *B. cinerea*. (Cuadro 6).

Para el caso de los aislados, para *Epicoccum italicum* y en menor medida de *Epicoccum layuense*, se observó un halo de inhibición, restringido a un área del medio APD coloración anaranjada entorno a la colonia del hongo que impedía el crecimiento de todos los aislados de *Botrytis cinerea* evaluados. El cambio de coloración en el medio probablemente esté asociado a la producción de metabolitos secundarios (del Frari *et al.*, 2019). Sin embargo, ninguno de estos aislados fue capaz de inhibir el crecimiento de *Botrytis* en el resto de la placa, por lo que su PICR fue negativo (<-30%) en todos los casos. Este resultado es contrastante a lo reportado para *E. layuense*, sobre el que se demostró PICR de *Phaeomoniella chlamydospora* >70% (Frari *et al.*, 2019) debido a varios factores, entre ellos, que la capacidad de biocontrol puede diferir entre aislados de la misma especie y que *P. chlamydospora* es un hongo de la madera, por lo que su hábito de crecimiento difiere de *B. cinerea* (Figura 20).

Sordaria fimicola fue la única especie no perteneciente al género *Trichoderma* que presentó un PICR positivo (22,12%). En contraparte, *Chaetomium elatum*, no logró un PICR positivo, a pesar de lo expuesto anteriormente donde se postulaba a este hongo como benéfico en paltos (Violi, *et al.*, 2007) (Cuadro 6).

Uno de los aislados del género *Coprinellus* fructificó en la placa (Figura 19 A), permitiendo recuperar basidiosporas y micelio desarrollado a partir de éstas. Este micelio proveniente de basidiosporas fue evaluado bajo el código BDT3bs. Aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, el aislado obtenido desde basidiosporas generó un PICR mayor que el obtenido desde el micelio (-25,2% y -30,5%, respectivamente) lo que sugiere que el micelio proveniente de basidiosporas puede tener un crecimiento acelerado o un sistema de defensa con mejor desempeño, con el fin de asegurar su supervivencia, a diferencia del micelio maduro capaz de fructificar. Los aislados de los géneros *Coprinellus*, *Arthrinium* y *Microthesium* obtuvieron un PICR menor al del testigo (>-30%), sin embargo, colonizaron alrededor de la mitad de la superficie de la placa y restringieron el avance de *Botrytis cinerea* sobre su espacio.

El género *Trichoderma* (aislados: bdt1, bct3, bct2 y bdt4) fue el único que inhibió significativamente a *Botrytis cinerea*, coherente a la información reportada en literatura (Dennis y Webster, 1971; Contreras-Cornejo, 2009; Thambulaga *et al.*, 2020).

En general los aislados se comportaron de manera similar, independiente de su especie, inicialmente se apreció un rápido crecimiento radial del organismo evaluado como ACB, hasta alcanzar el límite de avance de crecimiento *B. cinerea*. Entonces, *Trichoderma* invadió el área de crecimiento de *B. cinerea*, rodeándola o deteniendo su crecimiento completamente, sugiriendo un modo de control por competencia de recursos (Figura 12).

Finalmente, se evidenció una diferencia significativa en la efectividad del controlador hacia cada aislado de *Botrytis cinerea* estudiado. Interesantemente, aquellos aislados con pérdida

de sensibilidad a fenhexamid como a boscalid demostraron ser significativamente menos inhibidos que la cepa sensible absoluta (Cuadro 5).

Cuadro 5. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre el promedio del PICR efectuado por todos los aislados sobre diferentes cepas de *Botrytis cinerea* resistentes a fungicidas de interés comercial.

Cepa de <i>B. cinerea</i>	PICR (%)	
Resistente a fenhexamid	-3,3	A
Resistente a boscalid	-2,6	A
Control sensible	8,69	B

Letras diferentes entre medias indican diferencias estadísticamente significativas a la prueba Tukey (p-valor <0,05)

Cuadro 6. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del PICR (%) de distintas especies de hongos encontrados en vides hacia *Botrytis cinerea*.

Nombre científico	Cepa	PICR(%)											
<i>Talaromyces pinophilus</i>	BC5B	-38,8	A										
<i>Epicoccum italicum</i>	FC10A3	-37,8	A										
<i>Epicoccum italicum</i>	FC10A1	-34,8	A										
<i>Epicoccum italicum</i>	FD3C	-33,2	A										
<i>Chaetomium elatum</i>	BC3B	-32,7	A										
<i>Epicoccum italicum</i>	BC4F	-31,4	A										
<i>Coprinellus</i> sp.	BDT3m	-30,5	A	B									
<i>Epicoccum italicum</i>	BC1A	-27,8	A	B									
<i>Epicoccum italicum</i>	BC6A	-26,3	A	B	C								
<i>Epicoccum layuense</i>	FD3A1	-26	A	B	C								
<i>Coprinellus</i> sp.	BDT3s	-25,2	A	B	C								
<i>Arthriniium kogelbergense</i>	FD1A	-18,2	A	B	C								
<i>Microthesium</i> sp.	FD3A	-13,2	A	B	C	D							
<i>Arthriniium</i> sp.	FC11A	-9,52	A	B	C	D							
<i>Botrytis cinerea</i>	Control	-1,11		B	C	D	E						
<i>Trichoderma</i> sp3	BCT4	3,32			C	D	E	F					
<i>Trichoderma</i> sp6	FDT1	13,7				D	E	F	G				
<i>Sordaria fimicola</i>	BC1C	22,1					E	F	G	H			
<i>Trichoderma</i> sp2	BCT5	23,3					E	F	G	H			
<i>Trichoderma gamsii</i>	BDT2	30,7						F	G	H			
<i>Trichoderma</i> sp5	BDB2	35,7							G	H	I		
<i>Trichoderma guizhouense</i>	FCT1	39							G	H	I		
<i>Trichoderma</i> sp1	FCT2	41							G	H	I		
<i>Trichoderma virens</i>	BCT2	44,2								H	I		
<i>Trichoderma gamsii</i>	BDT1	56,8									I	J	
<i>Trichoderma atroviridae</i>	BCT3	57										I	J
<i>Trichoderma</i> sp4	BDT4	78,3											J

Letras diferentes entre medias indican diferencias

estadísticamente significativas a la prueba Tukey (p-valor <0,05)

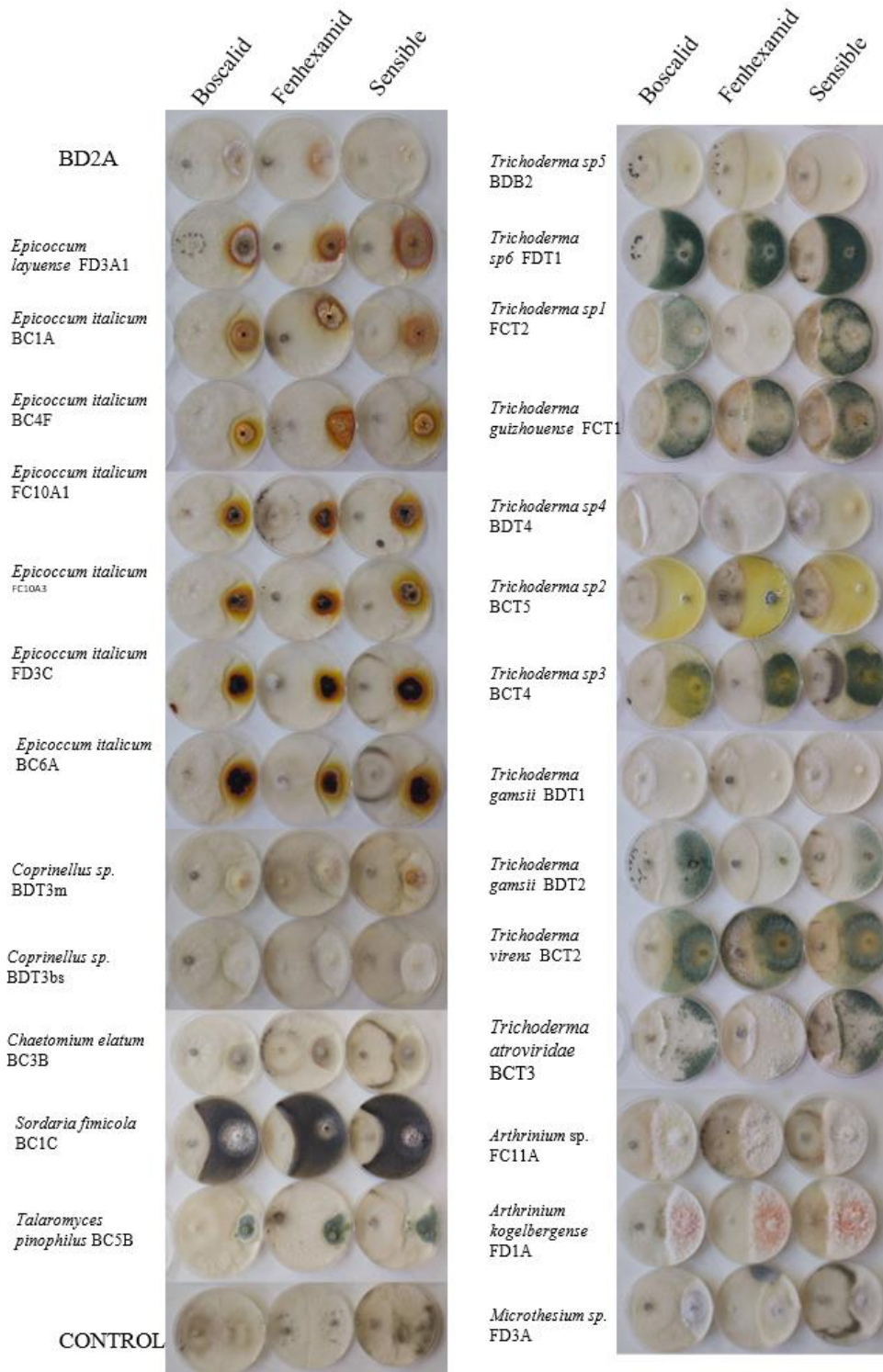


Figura 20. Cultivos duales de cepas de *Botrytis cinerea* con pérdida de sensibilidad a boscalid, fenhexamid y sensible absoluto, en conjunto con diferentes candidatos a ACB. 7 días de incubación, a 22°C en oscuridad continua y medio APD.

Evaluación de la capacidad de sobrevivencia en un medio con fungicidas de interés agronómico.

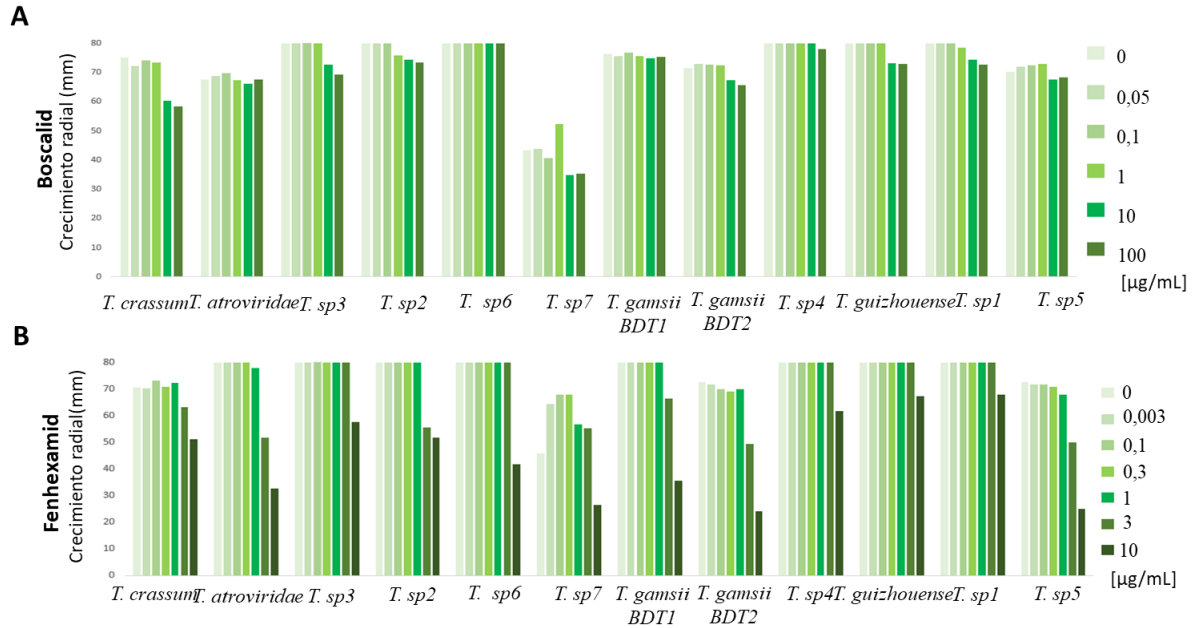


Figura 21. Diámetro de crecimiento micelial a los 5 días post siembra a 22°C de diferentes especies de *Trichoderma* bajo concentraciones crecientes de fungicidas de interés agronómico en sus respectivos medios.

Todo el género *Trichoderma* fue seleccionado como potencial ACB, por lo que se hicieron adicionalmente pruebas de crecimiento micelial en presencia de fungicidas comúnmente utilizados para el control de *Botrytis* en campo.

Para boscalid, los aislados de *Trichoderma virens* BCT2, *Trichoderma atroviride* BCT3, *Trichoderma gamsii* BDT1, *Trichoderma sp7* BD10A, *Trichoderma sp1* FCT2, *Trichoderma sp2* BCT5, *Trichoderma sp3* BCT4, *Trichoderma sp4* BDT4, *Trichoderma guizhouense* FCT1, colonizaron las placas completamente bajo todas las concentraciones evaluadas en medio APD.

Por otro lado, en medio AA, se observó un comportamiento similar donde todos los aislados a excepción de *Trichoderma atroviride* BCT3, *Trichoderma gamsii* BDT2 y *Trichoderma sp5* FDT1, no fueron inhibidos bajo ninguna concentración del fungicida.

Los aislados *Trichoderma sp6* BDB2 y *Trichoderma sp5* FDT1 no completaron el crecimiento de la placa, pero no experimentaron diferencias significativas del crecimiento en las diferentes concentraciones en ambos medios.

Para *Trichoderma gamsii* BDT2, se observó en medio APD una reducción de su crecimiento en las dos mayores concentraciones (10 y 100 $\mu\text{g/mL}$), mostrando sensibilidad a boscalid, bajo condiciones de sobreexposición al fungicida.

Para fenhexamid, se detectó sensibilidad de los aislados a concentraciones $>1\text{ppm}$, específicamente en *Trichoderma virens* BCT2. Mientras que en *Trichoderma atroviride* BCT3, *Trichoderma gammsii* BDT2 y BDT1, *Trichoderma sp7* BD10A, *Trichoderma sp 5* FDT1 y en el caso de *Trichoderma sp6* BDB2 se observó una disminución del crecimiento micelial en las concentraciones de 3 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

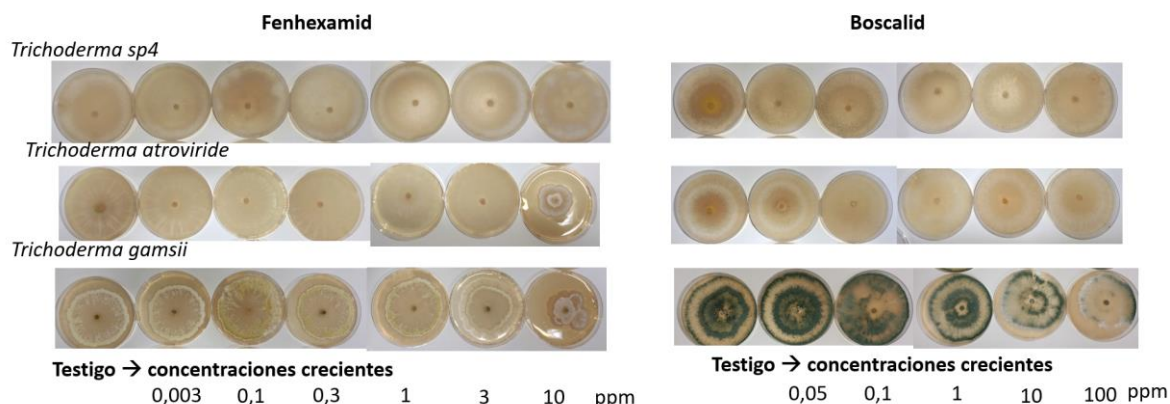


Figura 22. Crecimiento micelial de las tres especies con mayor PICR en medios de cultivo (APD y SIS) con concentraciones crecientes de fungicidas (boscalid y fenhexamid respectivamente) evaluadas a 5 días de edad.

Los resultados permiten advertir que fenhexamid afectaría más la efectividad de *Trichoderma* como ACB que boscalid. Los mecanismos celulares y moleculares que sustentan la resistencia a boscalid y la sensibilidad limitada a fenhexamid deben ser definidos en el futuro.

En Chile los aislados de *B. cinerea* tienen un EC_{50} para fenhexamid $>2\ \mu\text{g/mL}$ y los aislados resistentes pueden crecer en ambientes con $>10\ \mu\text{g/mL}$ (Esterio *et al.*, 2011). E inclusive, para boscalid, se ha detectado pérdida de sensibilidad cercana a una condición de resistencia donde se indican EC_{50} superiores a $100\ \mu\text{g/mL}$ (Esterio *et al.*, 2017), por lo que se espera que los hongos candidatos a una formulación comercial, sean capaces de sobrevivir a cualquier concentración de los botryticidas en orden de poder incorporar alternativas biológicas en los programas fitosanitarios.

La resistencia a los fungicidas en el género *Trichoderma* ya había sido reportada para moléculas fungicidas utilizadas para controlar enfermedades de la madera como mancozeb, azoxystrobin, azufre e incluso oxiclورو de cobre, mostrándose moderadamente resistente a tebuconazole (Marraschi *et al.*, 2018), siendo el grupo químico de fungicidas Azoles los que más impactan en el crecimiento de estos organismos (Tapwal *et al.*, 2012). Otros fungicidas, fueron probados en diferentes aislados de *T. harzianum* con resultados que muestran diferencias intraespecíficas en la sensibilidad a iprodione, hymexazol y tetratiocarbamato de sodio, y severa sensibilidad a Penycuron y metalaxil+mancozeb (Herrera *et al.*, 2012). Esto deriva en dificultades para realizar planes de manejo integrado, donde se busca compatibilizar ACB con productos químicos, lo que hace evidente que estudiar el efecto de las moléculas actualmente disponibles en campo y las nuevas moléculas candidatas a

convertirse en fungicidas comerciales sobre el crecimiento de ACB es estrictamente necesario.

Evaluación de la patogenicidad en bayas de uva de mesa de los candidatos a ACB.

Si bien la interacción entre especies del género *Trichoderma* y el género *Vitis* esta ha sido estudiada en su proceso de propagación de nuevas plantas (Marraschi *et al.*, 2018) y cortes de poda (Carro-Huerga *et al.*, 2021) logrando colonizar tejidos de la planta, es necesario estudiar la interacción del ACB con en el entorno donde se pretende utilizar.

Es por esto que *Trichoderma sp2*, *Trichoderma guizhouense*, *Trichoderma atroviridae*, *Trichoderma sp6*, *Trichoderma gamsii* BDT2, *Trichoderma sp1*, *Trichoderma gamsii* BDT1, *Trichoderma sp4*, *Trichoderma sp3*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma sp7*, fueron inoculados mediante una suspensión de 7×10^4 conidias /mL en bayas de uva de mesa en una cámara húmeda por 7 días. Ninguno de estos aislados mostró patogenicidad en bayas, obteniéndose una incidencia de 0 para todos los casos, no presentándose lesiones, pudriciones o pardeamientos de ningún tipo sobre la piel de las bayas (Figura 23). Aunque algunos aislados tuvieron un crecimiento micelial del hongo por sobre la baya, al retirar el micelio con papel absorbente, no se observó daño alguno, por lo que se estima que el género *Trichoderma* puede sobrevivir en bayas de uva de mesa sin generar patogenicidad, aun cuando los recursos son escasos.

Finalmente, una especie de *Trichoderma* (*Trichoderma sp4*) se perfila como el mejor candidato como Agente de Control Biológico (ACB), demostrando un PICR > 70%, tanto para aislados de *B. cinerea* con pérdida de sensibilidad, como sensible. Además, y de manera muy relevante, no fue afectado por ninguna concentración de los dos fungicidas en estudio en todos los medios analizados ni demostró patogenicidad en bayas de uva de mesa.



Figura 23. Bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless inoculadas con soluciones conidiales de **A.** *Trichoderma sp2* **B.** *Trichoderma guizhouense* **C.** *Trichoderma atroviridae* **D.** wáter **E.** *Trichoderma sp6* **F.** *Trichoderma gamsii* BDT2 **G.** *Trichoderma sp1* **H.** *Trichoderma gamsii* BDT1 **I.** *Trichoderma sp4* **J.** *Trichoderma sp3* **K.** *Trichoderma virens* **L.** *Trichoderma sp7*. Mantenidas en cámara húmeda durante 7 días a 22 °C.

CONCLUSIONES

De acuerdo con la metodología utilizada en el presente estudio y a las condiciones climáticas imperantes en la temporada de estudio, los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente:

- La microbiota fúngica asociada a flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless es diversa en especies y varía entre localidades, la composición en flores se mantiene en bayas, donde se incrementa la diversidad y riqueza de especies.
- Se obtuvo registro de la presencia de especies no reportadas en vides y/o en Chile, así como antecedentes que podrían indicar la presencia de nuevas especies.
- Se confirma la hipótesis del estudio, obteniéndose al menos tres aislados como potenciales ACB contra *Botrytis cinerea*, entre ellos uno capaz de sobrevivir en ambientes con alta concentración de fungicidas de uso común en campo.
- El uso potencial de las cepas de *Trichoderma* obtenidas en este estudio es compatible con las aplicaciones de fungicidas centrales en el control de *Botrytis*, presentando una alternativa para reducir las poblaciones de *Botrytis cinerea* con pérdida de sensibilidad a dichos fungicidas.
- Finalmente, es importante señalar que la genética del aislado de *Botrytis cinerea* puede impactar negativamente sobre la capacidad de acción de los ACB, ya que aislados con pérdida de sensibilidad a los fungicidas base comúnmente utilizados en campo para el control de *Botrytis cinerea* (fenhexamid y boscalid), resultaron estadísticamente más competitivos que el aislado sensible, sugiriendo con ello que el desarrollo de resistencias a fungicidas podría disminuir el efecto de control de los ACB.

BIBLIOGRAFIA

Abe, A., Asano, K. y Sone, T. (2010). A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(7), 1325–1331. <https://doi.org/10.1271/bbb.90718>.

Acuña, R. (2010). Compendio de Bacterias y Hongos de Frutales y Vides En Chile. *INIA*.

Ariyawansa, H. A., Thambugala, K. M., Manamgoda, D. S., Jayawardena, R., Camporesi, E., Boonmee, S., Wanasinghe, D. N., Phookamsak, R., Hongsanan, S., Singtripop, C., Chukeatirote, E., Kang, J. C., Jones, E. B. G. y Hyde, K. D. (2015). Towards a natural classification and backbone tree for Pleosporaceae. *Fungal Diversity*, 71(1), 85–139. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0323-z>.

Ariyawansa, H. A. y Hyde, K. D. (2018). Additions to *Pestalotiopsis* in Taiwan. *Mycosphere*, 9(5), 999–1013. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/9/5/4>.

Asgari, B. y Zare, R. (2011). The genus *Chaetomium* in Iran, a phylogenetic study including six new species. *Mycologia*, 103(4), 863–882. <https://doi.org/10.3852/10-349>.

Auger, J. y Esterio, M. (1997). Botrytis en vides de Chile: Epidemiología y resistencia a fungicidas. 3-9p. In: Esterio, M. y Auger, J. Botrytis: Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en la uva de mesa. *Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales*. Santiago-Chile. 125 p.

Aveskamp, M. M., Verkley, G.J.M., de Gruyter, J., Murace, M. A., Perelló, A., Joyce, H.C. Woudenberg, J. H.C, Groenewald, J. Z. y Crous, W. (2009) DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties, *Mycologia*, 101:3, 363-382, <https://doi.org/10.3852/08-199>.

Ayim, B. Y., Das, K., Cho, Y. J., Lee, S. Y. y Jung, H. Y. (2020). A New Record of *Epicoccum draconis* Isolated from the Soil in Korea. *Korean Journal of Mycology*, 48(1), 39–45. <https://doi.org/10.4489/KJM.20200004>.

Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J. y Robledo, C. (2008). *Infostat: manual del usuario*.

Bensch, K., Groenewald, J., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Summerell, B., Shin, H. D., Dugan, F., Schroers, H. J., Braun, U. y Crous, P. (2010). Species

and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, 67, 1–94. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>.

Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z. y Crous, P. W. (2012). The genus *cladosporium*. *Studies in Mycology*, 72, 1–401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>.

Bensch, K., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Dijksterhuis, J., Jurjević, Ž., Andersen, B., Houbraken, J., Crous, P. W. y Samson, R. A. (2018). *Cladosporium* species in indoor environments. *Studies in mycology*, 89, 177–301. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.03.002>.

Berbee M.L., Pirseyedi M., Hubbard S. (1999). *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*. 1999;91:964–977.

Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M. y Mills, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(1), E139-148. doi:10.1073/pnas.1317377110.

Braun, U., Hill, F. y Schubert, K. (2006). New species and new records of biotrophic micromycetes from Australia, Fiji, New Zealand and Thailand. *Fungal Diversity* 22: 13-35.

Burgess, L. W., Nelson, P. E., Toussoun, T. A. y Marasas, W. F. O. (1985). *Fusarium Scirpi*: Emended Description and Notes on Geographic Distribution. *Mycologia*, 77(2), 212–218. <https://doi.org/10.1080/00275514.1985.12025087>.

Cabrera-Aguas, M., Khoo, P., McCluskey, P. y Watson, S. L. (2021). Fungal Ocular Infections. *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818731-9.00119-1>.

Cai, L., Jeewon, R. y Hyde, K. D. (2006). Phylogenetic investigations of *Sordariaceae* based on multiple gene sequences and morphology. *Mycological Research*, 110(2), 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.09.014>.

Cai, F. y Druzhinina, I. S. (2021). In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity* (Vol. 107, Issue 1). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4>.

Carbone, I. y Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. *Mycologia*.91:553–556.

Carreras, S. (2011). Aplicaciones de La Bacteria Entomopatígena *Bacillus Thuringiensis* En El Control de Fitopatógenos. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12(2):129. doi: 10.21930/rcta.vol12_num2_art:222.

- Carro-Huerga, G., Mayo-Prieto, S., Rodríguez-González, L., Álvarez-García, S., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2021). The influence of temperature on the growth, sporulation, colonization, and survival of *Trichoderma* spp. in Grapevine Pruning Wounds. *Agronomy*, 11(9), 1771. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091771>.
- Chen, K. y Zhuang, W. Y. (2016). *Trichoderma shennongjianum* and *Trichoderma tibetense*, two new soil-inhabiting species in the Strictipile clade. *Mycoscience*, 57(5), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2016.04.005>.
- Chen, K. y Zhuang, W. Y. (2017). Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07807-3>.
- Chen, Q., Hou, L. W., Duan, W. J., Crous, P. W. y Cai, L. (2017b). *Didymellaceae* revisited. *Studies in Mycology*, 87, 105–159. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.06.002>.
- Chen, H., Li, C. J. y White, J. F. (2020a). First Report of *Epicoccum layuense* Causing Brown Leaf Spot on Oat (*Avena sativa*) in Northwestern China. *Plant Disease*, 104(3), 990. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-19-1984-pdn>.
- Chen, Y. J., Wan, Y. H., Zou, L. J. y Tong, H. R. (2020b). First report of leaf spot disease caused by *Epicoccum layuense* on *Camellia sinensis* in chongqing, China. *Plant Disease*, 104(7). <https://doi.org/10.1094/pdis-09-19-1906-pdn>.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. y López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149(3):1579–92. doi: 10.1104/pp.108.130369.
- Correa, S. Mello, M. Ávila, Z. R. Minaré Braúna, L. Pádua, R. R. y Gomes, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11(1),3-9. ISSN: 1562-3009.
- Crous, P. W. y Groenewald, J. Z. (2013). A Phylogenetic Re-Evaluation of *Arthrinium*. *IMA Fungus* 4(1):133–54. doi: 10.5598/imafungus.2013.04.01.13.
- Crous, P. W., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K. A., Schroers, H. J., Chaverri, P., Gené, J., Guarro, J., Hirooka, Y., Bensch, K., Kema, G. H. J., Lamprecht, S. C., Cai, L., Rossman, A. Y., Stadler, M., Summerbell, R. C., Taylor, J. W., Ploch, S., Visagie, C. M., ... Thines, M. (2021). *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology*, 98. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116>.

Dennis, C. y Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 25-IN3. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(71)80077-3).

Diguta, C. F., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H. y Rousseaux, S. (2011). PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*, 28(6), 1145–1154. doi:10.1016/j.fm.2011.03.006.

Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V. y Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749–759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>

Er, Y. (2020). Determination of antagonistic effect of bio-agents against cereal damping-off caused by *Fusarium graminearum* in wheat. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00245-w>.

Esmaeili Taheri, A., Hamel, C., Gan, Y. y Vujanovic, V. (2011). First report of *Fusarium redolens* from Saskatchewan and its comparative pathogenicity. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33(4), 559–564. <https://doi.org/10.1080/07060661.2011.620631>.

Esterio, M., Auger, J., Vasquez, E., Reyez, M. y Scheelje, F. (1992). Efficacy of a grapefruit seed extract BC-1000 for control of *Botrytis cinerea* in table grape in Chile Pp.: 211-214. In: “Recent advances in Botrytis research”. Proceedings of the 10th International Botrytis Symposium. Eds. K. Verhoeff, N. E. Malathrakis & B. Williamson. *Proceeding of the 10th International Botrytis Symposium*. 5 - 10 April. Heraklion, Crete, Greece. 1992. 294 p.

Esterio, M., Ramos, C. Walker, A-S., Fillinger, S., Leroux, P. y Auger J. (2011). Phenotypic and genetic characterization of *B. cinerea* Chilean isolates of different levels of fenhexamid sensitivity. *Phytopathologia Mediterranea*, 2011, 50,414-420.

Esterio, M., Araneda, M. J., Román, A., Pizarro, L., Copier, C. y Auger, J. (2015). First Report of Boscalid Resistant *Botrytis cinerea* Isolates Carrying the Mutations H272R, H272Y, P225L, and P225H from Table Grape in Chile. *Plant Disease*, 99(6), 891. <https://doi.org/10.1094/pdis-12-14-1257-pdn>.

Esterio, M., Copier, Ch., Román, A., Araneda, M.J., Rubilar, M., Pérez, I. y J. Auger. (2017). Frequency of fungicide-resistant *Botrytis cinerea* populations isolated from ‘Thompson Seedless’ table grapes in the Central Valley of Chile. *Cien. Inv. Agr.* 44(3):295-306.

Esterio, M., Osorio-Navarro, C., Carreras, C., Azócar, M., Copier, C., Estrada, V., Rubilar, M. y Auger, J. (2020). *Botrytis prunorum* Associated to *Vitis vinifera* Blossom Blight in Chile. *Plant Disease*, 104(9), 2324–2329. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-19-2055-sc>.

Esterio, M., Osorio-Navarro, C., Azócar, M., Copier, C., Rubilar, M., Pizarro, L. y Auger, J. (2021). Reduced fitness cost and increased aggressiveness in fenhexamid-resistant *Botrytis*

cinerea field isolates from Chile. *Phytopathologia Mediterranea*, 60(1), 69–77. <https://doi.org/10.36253/phyto-10723>.

Frari, G., Cabral, A., Nascimento, T., Boavida Ferreira, R. y Oliveira, H. (2019). *Epicoccum layuense* a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine. *PLOS ONE*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213273>.

Gilbert, J. A., van der Lelie, D. y Zorraonaindia, I. (2013). Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 5–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320471110>.

Glass, N. L. y Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323–1330. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>.

Güngör R, N. y Yildiz, M. (2021). Molecular Identification of *Diplodia seriata* Causing Dieback Effect on Grapevines and Evaluation of Five Different Synthetic Fungicide Efficacy against This Disease in Vitro. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. <https://doi.org/10.23902/trkjnat.863506>.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Harteveld, D. O. C., Akinsanmi, O. A. y Drenth, A. (2012). Multiple *Alternaria* species groups are associated with leaf blotch and fruit spot diseases of apple in Australia. *Plant Pathology*, 62(2), 289–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02637.x>.

Hawksworth, D. (2011). A New Dawn for the Naming of Fungi: Impacts of Decisions Made in Melbourne in July 2011 on the Future Publication and Regulation of Fungal Names. *MycKeys* 1(2):7–20. doi: 10.3897/mycokeys.1.2062.

Heinfling, A., Bergbauer, M. y Szewzyk, U. (1997). Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(2), 261–266. <https://doi.org/10.1007/s002530051048>.

Hernández-Restrepo, M., Madrid, H., Tan, Y., Cunha, K. D., Gené, J., Guarro, J. y Crous, P. (2018). Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41(1), 71–108. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.051>.

Herrera, R. Nunez, D. Romero, N. Besoain, X. Perez, L. y Montealegre, J. (2012). Sensitivity of wild-type and mutant *Trichoderma harzianum* strains to fungicides. *Ciencia e investigación agraria*. 39. 569-576.

Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T., Abeywickrama, P. D., Aluthmhandiram, J. V. S., Brahamanage, R. S., Brooks, S., Chaiyasen, A., Chethana, K. W. T., Chomnunti, P., Chepkirui, C., Chuankid, B., de Silva, N. I., Doilom, M., Faulds, C., Gentekaki, E., . . . Stadler, M. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, 97(1), 1–136. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>.

Hong, S. B., Go, S. J., Shin, H. D., Frisvad, J. C. y Samson, R. A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97(6), 1316–1329. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1316>.

Houbraken, J., Visagie, C. M., Meijer, M., Frisvad, J. C., Busby, P. E., Pitt, J. I., Seifert, K. A., Louis-Seize, G., Demirel, R., Yilmaz, N., Jacobs, K., Christensen, M. y Samson, R. A. (2014). A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section Aspergilloides. *Studies in Mycology*, 78(1), 373–451. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.002>.

Huang, M. y Bau, T. (2018). New findings of *Coprinellus* species (Psathyrellaceae, agaricales) in China. *Phytotaxa*, 374(2), 119–128. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.374.2.3>.

Jaklitsch, W. M., Komon, M., Kubicek, C. P. y Druzhinina, I. S. (2005). *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycologia*, 97(6), 1365–1378. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1365>.

Jaklitsch, W. M., Stadler, M. y Voglmayr, H. (2012). Blue pigment in *Hypocrea caerulescens* sp. nov. and two additional new species in sect. *Trichoderma*. *Mycologia*, 104(4), 925–941. [doi:10.3852/11-327](https://doi.org/10.3852/11-327).

Jang, Y., Huh, N., Lee, J., Lee, J. S., Kim, G. H. y Kim, J. J. (2011). Phylogenetic analysis of major molds inhabiting woods and their discoloration characteristics. Part 2. Genus *Penicillium*. *Holzforschung*, 65(2), 265–270. <https://doi.org/10.1515/HF.2011.019>.

Khan, A. L., Waqas, M., Hussain, J., Al-Harrasi, A. y Lee, I. J. (2013). Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 can reduce cadmium toxicity in *Solanum lycopersicum* (Sitiens and Rhe). *Biology and Fertility of Soils*, 50(1), 75–85. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0833-3>.

Knob, A., Beitel, S. M., Fortkamp, D., Terrasan, C. R. F. y Almeida, A. F. D. (2013). Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate. *BioMed Research International*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/728735>.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096.

Ladaniya, M. S. (2008). Postharvest diseases and their management. *Citrus Fruit*, 417-XIX. <https://doi.org/10.1016/b978-012374130-1.50018-8>.

Latorre, B. A., Elfar, K., y Ferrada, E. E. (2015). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. In. Pontificia Universidad Católica de Chile: *Ciencia e Investigación Agraria*. vol. 42, n.3, pp.305-330. ISSN 0718-1620.

Liu, Y.L., Whelen, S., Hall, B.D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799-1808.

Liu, B., Ichinose, T., He, M., Kobayashi, F., Maki, T., Yoshida, S., Yoshida, Y., Arashidani, K., Takano, H., Nishikawa, M., Sun, G. y Shibamoto, T. (2014). Lung inflammation by fungus, *Bjerkandera adusta* isolated from Asian sand dust (ASD) aerosol and enhancement of ovalbumin-induced lung eosinophilia by ASD and the fungus in mice. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1710-1492-10-10>.

Maharachchikumbura, S., Hyde, K., Groenewald, J., Xu, J. y Crous, P. (2014). Pestalotiopsis revisited. *Studies in Mycology*, 79(1), 121–186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>.

Manamgoda, D., Rossmann, A., Castlebury, L., Crous, P., Madrid, H., Chukeatirote, E. y Hyde, K. (2014). The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, 79(1), 221–288. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>.

Marraschi, R., Ferreira, A. B. M., da Silva Bueno, R. N., Leite, J. A. B. P., Lucon, C. M. M., Harakava, R., Leite, L. G., Padovani, C. R. y Bueno, C. J. (2018). A protocol for selection of *Trichoderma* spp. to protect grapevine pruning wounds against *Lasiodiplodia theobromae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(1), 213–221. <https://doi.org/10.1007/s42770-018-0029-y>.

Massi, F., Torriani, S., Borghi, L. y Toffolatti, S. L. (2021). Fungicide Resistance Evolution and Detection in Plant Pathogens: *Plasmopara viticola* as a Case Study. *Microorganisms*, 9(1), 119. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010119>.

Montealegre, J. R. y Pérez, L. M. (editores). (2013). *Control biológico de enfermedades de las plantas en Chile*. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 147 p.

Mujica, F., & Vergara, C. (1980). *Flora Fungosa Chilena* (2.^a ed.). Editorial Universitaria.

Nath, R., Barua, S., Barman, J., Swargiary, P., Borgohain, M. y Saikia, L. (2015). Subcutaneous Mycosis Due to *Cladosporium cladosporioides* and *Bipolaris cynodontis* from Assam, North-East India and Review of Published Literature. *Mycopathologia*, 180(5-6), 379–387. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9926-x>.

Newcombe, G., Campbell, J., Griffith, D., Baynes, M., Launchbaugh, K. y Pendleton, R. (2016). Revisiting the life cycle of dung fungi, including *Sordaria fimicola*. *PLOS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147425>.

ODEPA. (2022). *Exportaciones de Fruta*. Boletín de la Fruta 2022. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Recuperado 17 de julio de 2022, de <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMDExYTQ1YTQtYmUzYS00N2Y3LTg4MGUtNDBmNDE1YTE5MzhmIiwidCI6IjMzYjdmNzA3LTZlNmYtNDJkMi04ZDZmLTk4YmZmOWZiNWZhMCIsImMiOiR9>.

Oliveira, M., Arenas, M., Lage, O., Cunha, M. y Amorim, M. I. (2017). Epiphytic fungal community in *Vitis vinifera* of the Portuguese wine regions. *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 93–102. doi:10.1111/lam.12826.

Oliveira, R. C., Goncalves, S. S., Silva, C. D. C., Dilkin, P., Madrid, H. y Correa, B. (2019). Polyphasic characterization of *Epicoccum sorghinum*: A tenuazonic acid producer isolated from sorghum grain. *International Journal of Food Microbiology*, 292(December 2018), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.004>.

Overy, D. P. y Blunt, J. W. (2004). Corymbiferan Lactones from *Penicillium hordei*: Stimulation of Novel Phenolic Metabolites Using Plant Tissue Media. *Journal of Natural Products*, 67(11), 1850–1853. doi:10.1021/np049723c.

Pan, B. F., Su, X., Hu, B., Yang, N., Chen, Q. y Wu, W. (2015). *Fusarium redolens* 6WBY3, an endophytic fungus isolated from *Fritillaria unibracteata* var. wabuensis, produces peimisine and imperialine-3 β -d-glucoside. *Fitoterapia*, 103, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.04.006>.

Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., Pertot, I. y Campisano, A. (2012). Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Crop Management. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4308-4317. doi:10.1128/aem.07655-11.

Pavan, H., Murthy, S. M. y Jogaiah, S. (2021). Explorations of fungal diversity in extreme environmental conditions for sustainable agriculture applications. *Biocontrol Agents and Secondary Metabolites*, 483–494. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822919-4.00021-1>.

Pryor, B.M. y Michailides, T.J. (2002) Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with Alternaria late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92, 406-416. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.4.406.

Rinu, K., Sati, P. y Pandey, A. (2013). *Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177): A newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting, and antagonistic fungal strain. *Journal of Basic Microbiology*, 54(5), 408–417. doi:10.1002/jobm.201200579.

Rehner, S.A., y Samuels, G.J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Fungal Biology*, 98, 625-634.

Rodríguez-Serrano, C., Guzmán-Moreno, J., Ángeles-Chávez, C., Rodríguez-González, V., Ortega-Sigala, J. J., Ramírez-Santoyo, R. M. y Vidales-Rodríguez, L. E. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium scirpi* and its potential as antimicrobial agent against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *PLOS ONE*, 15(3), e0230275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230275>.

Ronseaux, S., Clément, C. y Barka, E. (2013). Interaction of *Ulocladium atrum*, a Potential Biological Control Agent, with *Botrytis cinerea* and Grapevine Plantlets. *Agronomy*, 3(4), 632–647. <https://doi.org/10.3390/agronomy3040632>.

Salvatore, M. M., Andolfi, A. y Nicoletti, R. (2021). The Genus *Cladosporium*: A Rich Source of Diverse and Bioactive Natural Compounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(13), 3959. <https://doi.org/10.3390/molecules26133959>.

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T. y Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78(1), 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>.

Sánchez-López, V., Martínez-Bolaños, L., Zavala-González, E. A. y Ramírez-Lepe, M. (2012). Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas. *Revista mexicana de micología*, 36, 17-26. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802012000200004&lng=es&tlng=es.

Sánchez, S., Herrera, R., Besoain-Canales, X., Perez, Luz. y Montealegre, J. (2013). In vitro and in vivo inhibitory effect of solid and liquid *Trichoderma harzianum* formulations on bicontrol of *Pyrenochaeta lycopersici*. *Interciencia*. 38. 425-429.

Santini, A., Mikušová, P., Sulyok, M., Krska, R., Labuda, R. y Šrobárová, A. (2014). *Penicillium* strains isolated from Slovak grape berries taxonomy assessment by secondary metabolite profile. *Mycotoxin Research*, 30(4), 213–220. doi:10.1007/s12550-014-0205-3.

Schloss, P. D. (2020). Reintroducing mothur: 10 Years Later. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(2). doi:10.1128/aem.02343-19.

Sempere, F. y Santamarina, M. P. (2007). In vitro biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathologia*, 163(3), 183–190.

Sharma, K., Goss, E. M., Dickstein, E. R., Smith, M. E., Johnson, J. A., Southwick, F. S., & van Bruggen, A. H. (2014). *Exserohilum rostratum*: characterization of a cross-kingdom pathogen of plants and humans. *PloS one*, 9(10), e108691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108691>.

Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature* 163:688.

Staats, M. (2004). Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22(2), 333–346. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi020>

Steenwerth, K. L., Morelan, I., Stahel, R., Figueroa-Balderas, R., Cantu, D., Lee, J., Runnebaum, R. C. y Poret-Peterson, A. T. (2021). Fungal and bacterial communities of ‘Pinot noir’ must: effects of vintage, growing region, climate, and basic must chemistry. *PeerJ*, 9, e10836. <https://doi.org/10.7717/peerj.10836>.

Stošić, S., Ristić, D., Gašić, K., Starović, M., Ljaljević Grbić, M., Vukojević, J. y Živković, S. (2020). *Talaromyces minioluteus*: New Postharvest Fungal Pathogen in Serbia. *Plant disease*, 104(3), 656–667. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1806-RE>.

Sun, B. D., Chen, A. J., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Wu, W. P., Wei, H. L., Zhou, Y. G., Jiang, X. Z. y Samson, R. A. (2020). New section and species in *Talaromyces*. *MycKeys*, 68, 75–113. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.68.52092>.

Tabilo-Osorio, H. (2014). Evaluación de biocontroladores de *Diplodia seriata*, en sarmientos no enraizados de uva de mesa cv. Thompson Seedless bajo condiciones de laboratorio. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/148570>.

Taguam, J. D., Evallo, E. y Balendres, M. A. (2021). *Epicoccum* species: Ubiquitous plant pathogens and effective biological control agents. *European Journal of Plant Pathology*, 159(4), 713–725. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02207-w>.

Talavera G. y J. Castresana. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol.*56(4):564-77.

Tapwal, A., Kumar, R., Gautam, N., & Pandey, S. (2012). Compatibility of *Trichoderma viride* for selected fungicides and botanicals. *International Journal of Plant Pathology*, 3(2), 89–94. <https://doi.org/10.3923/ijpp.2012.89.94>.

Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J. L., Kannangara, S. D. y Promputtha, I. (2020). Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied

Against Fungal Plant Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>.

Torres, A. (2017). Manual de Cultivo de Uva de Mesa. Convenio INIA-INDAP. *Boletín INIA* 18:152.

Vilgalys, R. y Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of bacteriology*, 172(8), 4238–4246. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>.

Violi, H. A., Menge, J. A. y Beaver, R. J. (2007). *Chaetomium elatum* (Kunze: Chaetomiaceae) as a root-colonizing fungus in avocado: is it a mutualist, cheater, commensalistic associate, or pathogen? *American Journal of Botany*, 94(4), 690–700. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.4.690>.

Visagie, C., Houbraken, J., Frisvad, J., Hong, S. B., Klaassen, C., Perrone, G., Seifert, K., Varga, J., Yaguchi, T. y Samson, R. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.

Visagie, C. y Houbraken, J. (2020). Updating the taxonomy of *Aspergillus* in South Africa. *Studies in Mycology*, 95, 253–292. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.02.003>.

Wang, C. G., Vlasák, J. y Dai, Y. C. (2021). Phylogeny and diversity of *Bjerkandera* (Polyporales, Basidiomycota), including four new species from South America and Asia. *MycKeys*, 79, 149–172. <https://doi.org/10.3897/MYCOKEYS.79.63908>.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. PCR protocols, a guide to methods and applications. San Diego, California: *Academic Press*. p315-322.white.

Woudenberg, J., Groenewald, J., Binder, M. y Crous, P. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171–212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>.

Woudenberg, J. H. C., M. F. Seidl, J. Z. Groenewald, M. de Vries, J. B. Stielow, B. P. H. J. Thomma y P. W. Crous. (2015). *Alternaria* Section *Alternaria*: Species, Formae Speciales or Pathotypes?. *Studies in Mycology* 82:1–21. doi: 10.1016/j.simyco.2015.07.001.

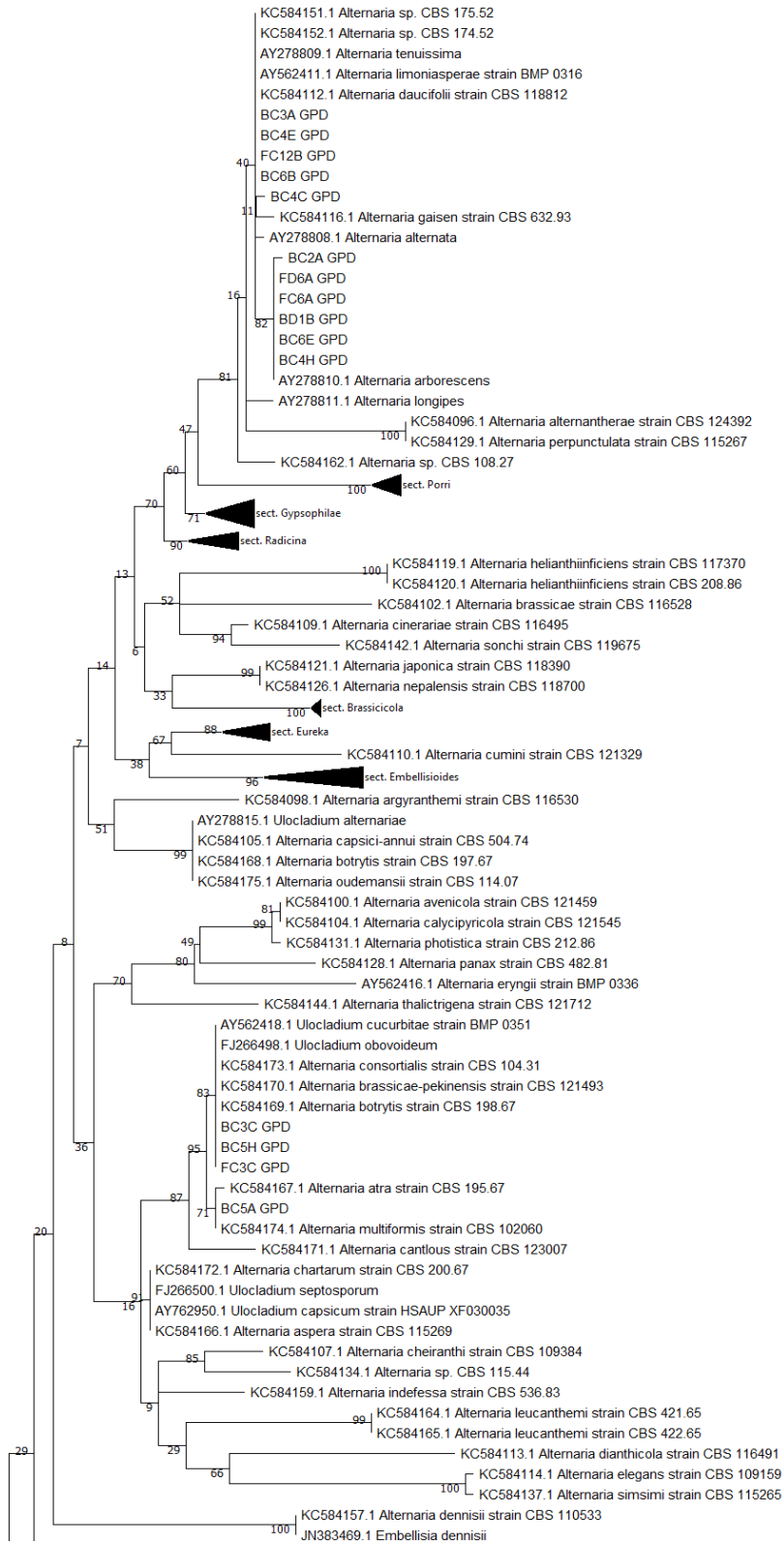
Xu, Y., Zhang, J., Shao, J., Feng, H., Zhang, R. y Shen, Q. (2020). Extracellular proteins of *Trichoderma guizhouense* elicit an immune response in maize (*Zea mays*) plants. *Plant and Soil*. doi:10.1007/s11104-020-04435-1 6/b978-0-444-59576-8.00034-5.

- Yang, T., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Lombard, L. y Crous, P. W. (2017). Families, genera, and species of *Botryosphaeriales*. *Fungal Biology*, 121(4), 322–346. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>.
- Yilmaz, N., Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C. y Samson, R. A. (2014). Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology*, 78(1), 175–341. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.08.001>.
- Yin, C., Luo, F., Zhang, H., Fang, X., Zhu, T. y Li, S. (2021). First report of *Arthrinium kogelbergense* causing Blight Disease of *Bambusa intermedia* in Sichuan province, China. *Plant Disease*, 105(1). <https://doi.org/10.1094/pdis-06-20-1159-pdn>.
- Zeilinger, S. y Gruber, S. (2014). Insights into Signaling Pathways of Antagonistic *Trichoderma* Species. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 465–476. doi:10.101.
- Zhang, J., Zhang, L., Li, G. Q., Yang, L., Jiang, D. H., Zhuang, W. Y. y Huang, H. C. (2010). *Botrytis sinoallii*: a new species of the grey mould pathogen on *Allium* crops in China. *Mycoscience*, 51(6), 421–431. <https://doi.org/10.1007/S10267-010-0057-4>.
- Zhang, S., Chen, X., Zhong, Q., Zhuang, X. y Bai, Z. (2019). Microbial Community Analyses Associated with Nine Varieties of Wine Grape Carposphere Based on High-Throughput Sequencing. *Microorganisms*, 7(12). doi:10.3390/microorganisms7120668.
- Zheng, H., Qiao, M., Lv, Y., Du, X., Zhang, K. Q. y Yu, Z. (2021). New Species of *Trichoderma* Isolated as Endophytes and Saprobies from Southwest China. *Journal of Fungi*, 7(6), 467. <https://doi.org/10.3390/jof7060467>.

APÉNDICE I

Cuadro 1. Regiones génicas secuenciadas en cada aislado identificado en la microbiota de flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless (Temporada 2020-2021).

Nombre científico	Nomenclatura	Regiones génicas utilizadas						
		ITS	LSU	GPDH	TEF1	BenA	RPB2	CaM
<i>Arthrinium kogelbergense</i>	FD1J	x	x					
<i>Arthrinium kogelbergense</i>	FD1A	x	x			x		
<i>Arthrinium sp</i>	FC11A	x	x			x		
<i>Alternaria sp1</i>	BC1H	x		x	x			
<i>Alternaria sp2</i>	BC5F	x		x				
<i>Alternaria sp3</i>	BC5A	x		x	x			
<i>Alternaria sp3</i>	BC3C	x		x	x			
<i>Alternaria sp3</i>	BC5H	x		x	x			
<i>Alternaria sp3</i>	FC3C	x		x	x			
<i>Alternaria sp4</i>	BD1A	x			x			
<i>Alternaria sp4</i>	BC6G	x			x			
<i>Alternaria sp5</i>	FC12B	x		x	x			
<i>Alternaria sp5</i>	BC6B	x		x	x			
<i>Alternaria sp5</i>	BC4E	x		x	x			
<i>Alternaria sp5</i>	BC3A	x		x	x			
<i>Alternaria arborecens</i>	BC2A	x		x	x			
<i>Alternaria arborecens</i>	BC4H	x		x	x			
<i>Alternaria arborecens</i>	BC6E	x		x	x			
<i>Alternaria arborecens</i>	BD1B	x		x	x			
<i>Alternaria arborecens</i>	FC6A	x		x	x			
<i>Alternaria multiformis sp6</i>	BC5A	x		x	x			
<i>Alternaria multiformis sp6</i>	BC4K	x		x				
<i>Exserohilum rostratum</i>	BC6C	x	x	x		x		
<i>Bipolaris cynodontis</i>	BC1F	x	x	x		x		
<i>Fusarium redolens</i>	BD8C	x	x		x			
<i>Fusarium scirpi</i>	BC5L	x	x		x			
<i>Epicoccum layuense</i>	FD3A1	x	x			x		
<i>Epicoccum italicum</i>	FD3C	x	x			x		
<i>Epicoccum italicum</i>	FC10A3	x	x			x		
<i>Epicoccum italicum</i>	FC10A1	x	x			x		
<i>Epicoccum italicum</i>	BC1A	x	x			x		
<i>Epicoccum italicum</i>	BC4F	x	x			x		
<i>Epicoccum italicum</i>	BC6A	x	x			x		
<i>Sordaria fimicola</i>	BC1C	x	x			x		
<i>Chaetomium elatum</i>	BC3B	x	x			x		
<i>Aspergillus sp1</i>	FA1	x						
<i>Aspergillus sp1</i>	FDA1	x						
<i>Aspergillus sp2</i>	BCA1	x						
<i>Aspergillus sp2</i>	BCA2	x						
<i>Penicillium crocicola</i>	BD11CB	x	x			x		x
<i>Penicillium crocicola</i>	BCT1	x	x			x		x
<i>Penicillium crocicola</i>	BC3G	x	x			x		x
<i>Penicillium crocicola</i>	BC5P	x	x			x		x
<i>Penicillium crocicola</i>	BD1C	x	x			x		x
<i>Penicillium glabrum</i>	FC11C	x	x			x		x
<i>Penicillium polonicum</i>	FD5B	x	x			x		x
<i>Penicillium polonicum</i>	FC3B	x	x			x		x
<i>Penicillium sp</i>	FC5A	x	x			x		x
<i>Penicillium sp</i>	FD5A	x	x			x		x
<i>Penicillium expansum</i>	BD1E	x	x			x		x
<i>Penicillium expansum</i>	BC5G	x	x			x		x
<i>Penicillium expansum</i>	BD10B	x	x			x		x
<i>Penicillium expansum</i>	FD2A	x	x			x		x
<i>Penicillium janthinellum</i>	BD8B	x	x			x		x
<i>Talaromyces pinophilus</i>	BC5B	x				x		x
<i>Talaromyces galapagensis</i>	FD1D	x				x		x
<i>Talaromyces aurantiacus</i>	BC1D	x				x		x
<i>Talaromyces minioluteus</i>	BD8A	x				x		x
<i>Cladosporium artropodii</i>	BC4D	x			x			
<i>Cladosporium australiense</i>	BD11CA	x			x			
<i>Cladosporium sp</i>	BD3A	x		x	x			
<i>Diplodia seriata</i>	BC6D	x						
<i>Pestalotiopsis hawaiiensis</i>	FC1A	x			x			
<i>Trichoderma virens</i>	BCT2	x			x		x	
<i>Trichoderma atroviride</i>	BCT3	x					x	
<i>Trichoderma gamsii</i>	BDT1	x			x		x	
<i>Trichoderma gamsii</i>	BDT2	x			x		x	
<i>Trichoderma sp7</i>	BD10A	x			x		x	
<i>Trichoderma sp6</i>	FDT1	x			x			
<i>Trichoderma sp5</i>	BDB2	x			x		x	
<i>Trichoderma sp4</i>	BDT4	x			x		x	
<i>Trichoderma sp1</i>	FCT2	x			x			
<i>Trichoderma guizhouense</i>	FCT1	x			x		x	
<i>Trichoderma sp2</i>	BCT5	x			x		x	
<i>Trichoderma sp3</i>	BCT4	x			x		x	
<i>Rhizopus oryzae</i>	BDR1	x						
<i>Rhizopus oryzae</i>	FCR1	x						
<i>Rhizopus oryzae</i>	BDR1	x						
<i>Rhizopus oryzae</i>	FDR1	x						
<i>Bjerkandera adusta</i>	BC4G	x	x					
<i>Bjerkandera adusta</i>	BC5C	x	x					
<i>Coprinelus domesticus</i>	BDT3	x						
<i>Coprinelus domesticus</i>	BC6F	x						
<i>Coprinelus sp</i>	FC11B	x						



(Continúa...)

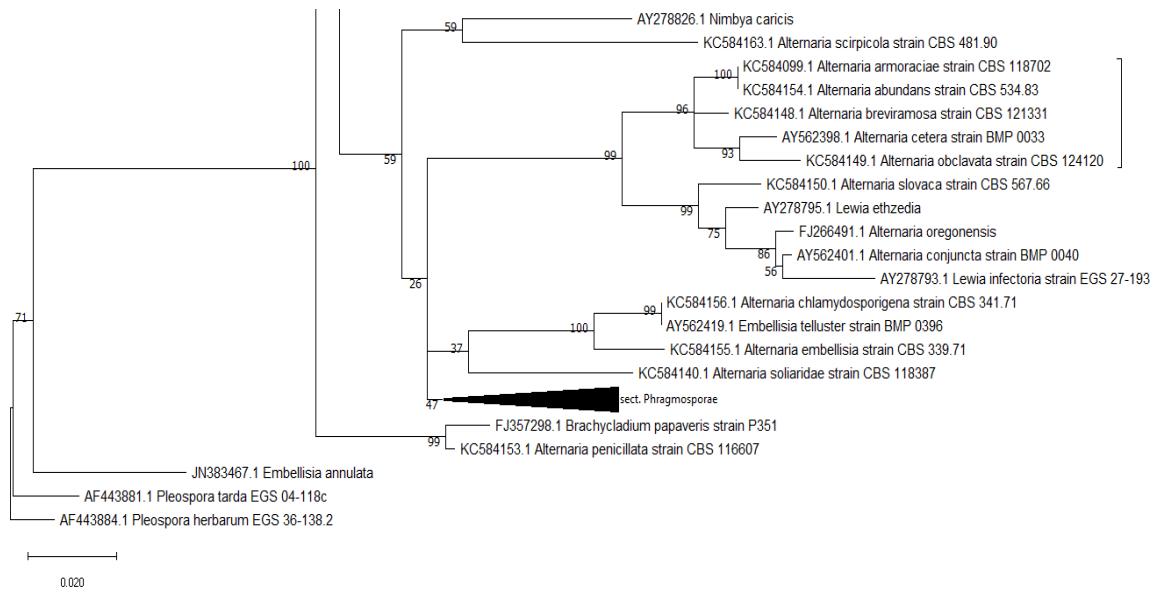
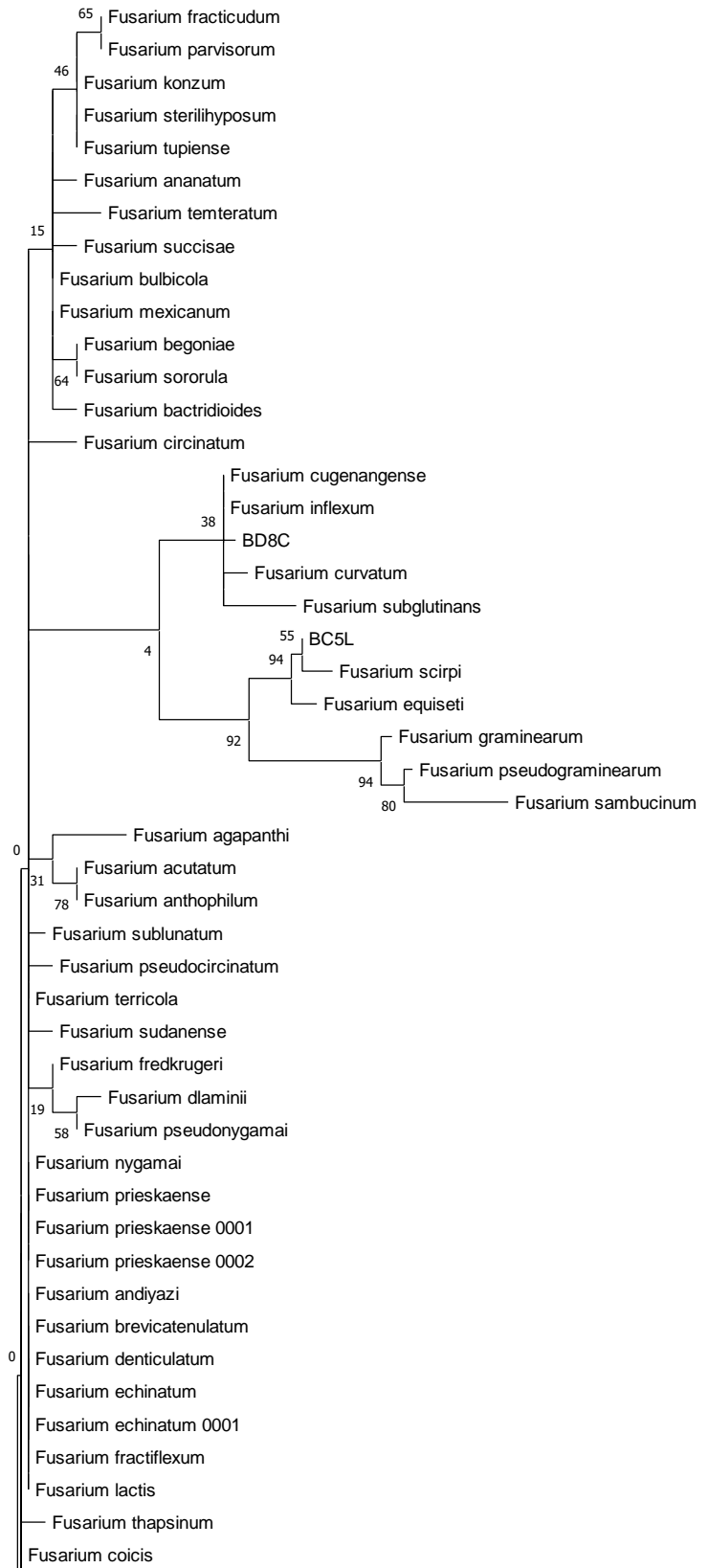


Figura 2. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, LSU y BenA incluyendo 71 especies de *Alternaria* y *Pleospora herbarum* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos. Se presentan los nombres científicos previos a 2012.



(Continúa...)

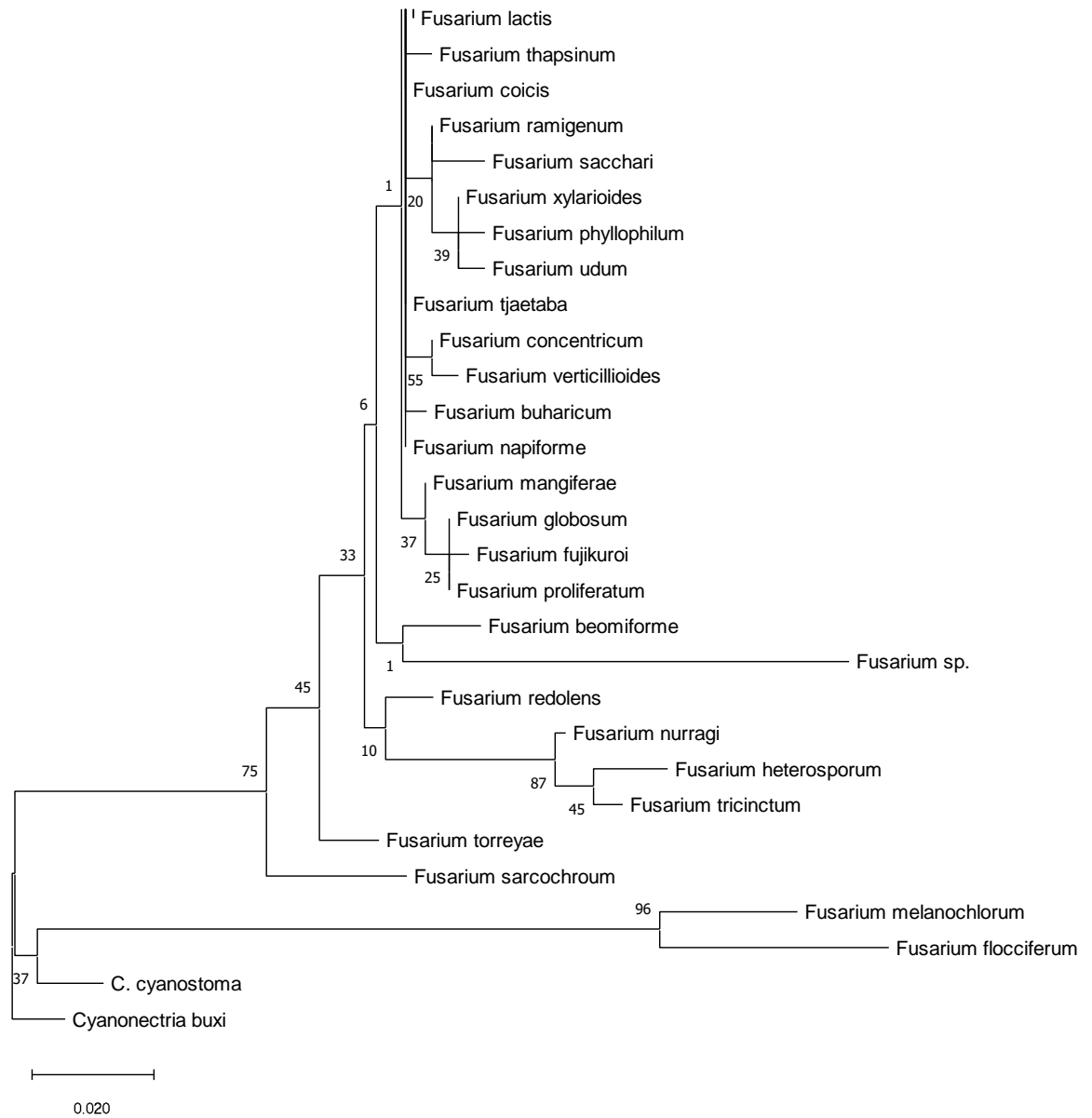


Figura 3. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, LSU y TEF, de 90 especies de *Fusarium* utilizando *Cyanonectria buxi* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos.

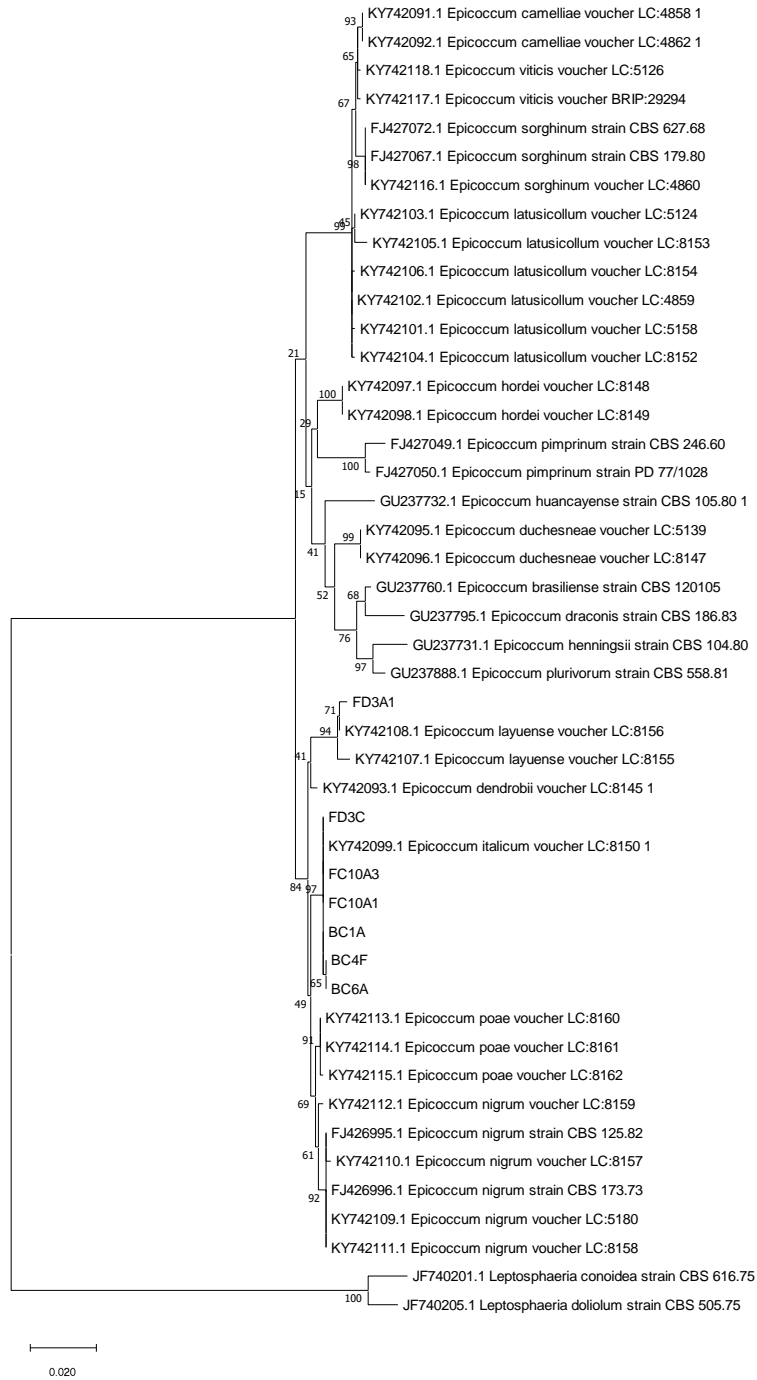


Figura 4. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, LSU y BenA de 17 especies de *Epicoccum* utilizado *Leptosphaeria doliolum* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos.

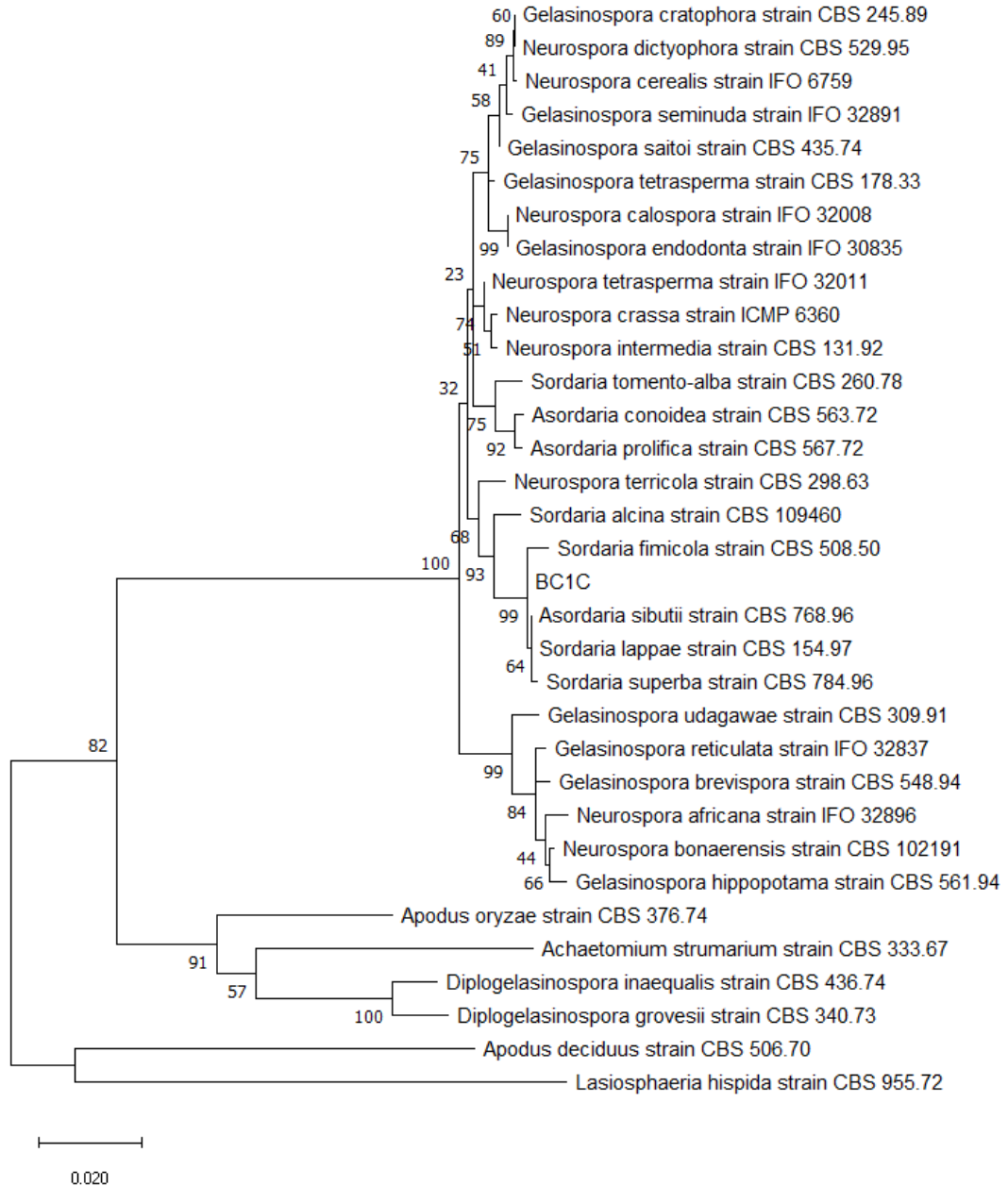


Figura 5. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, LSU y BenA de 32 especies de *Sordaria* utilizando *Laiosphaeria hispida* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos.

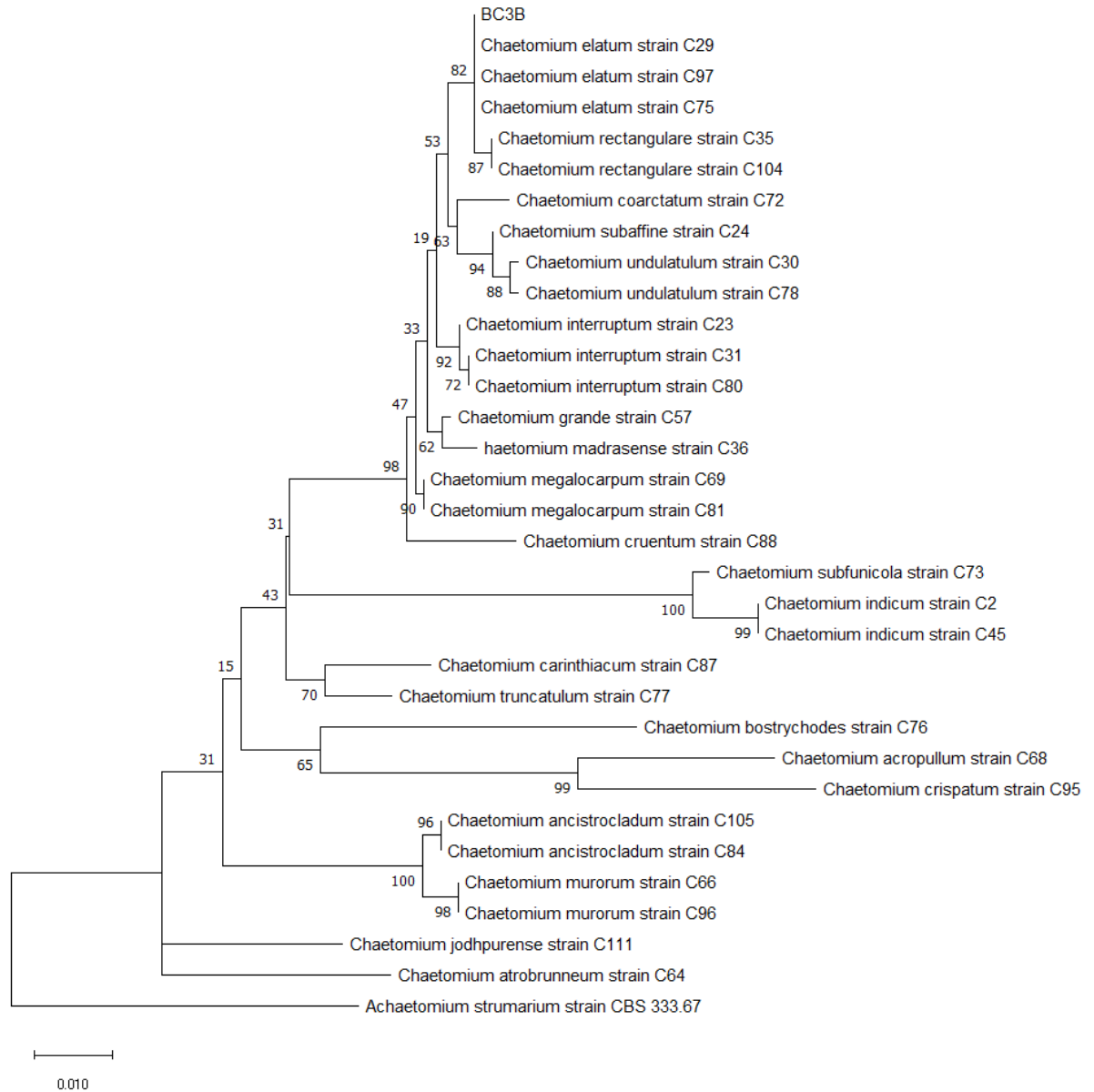
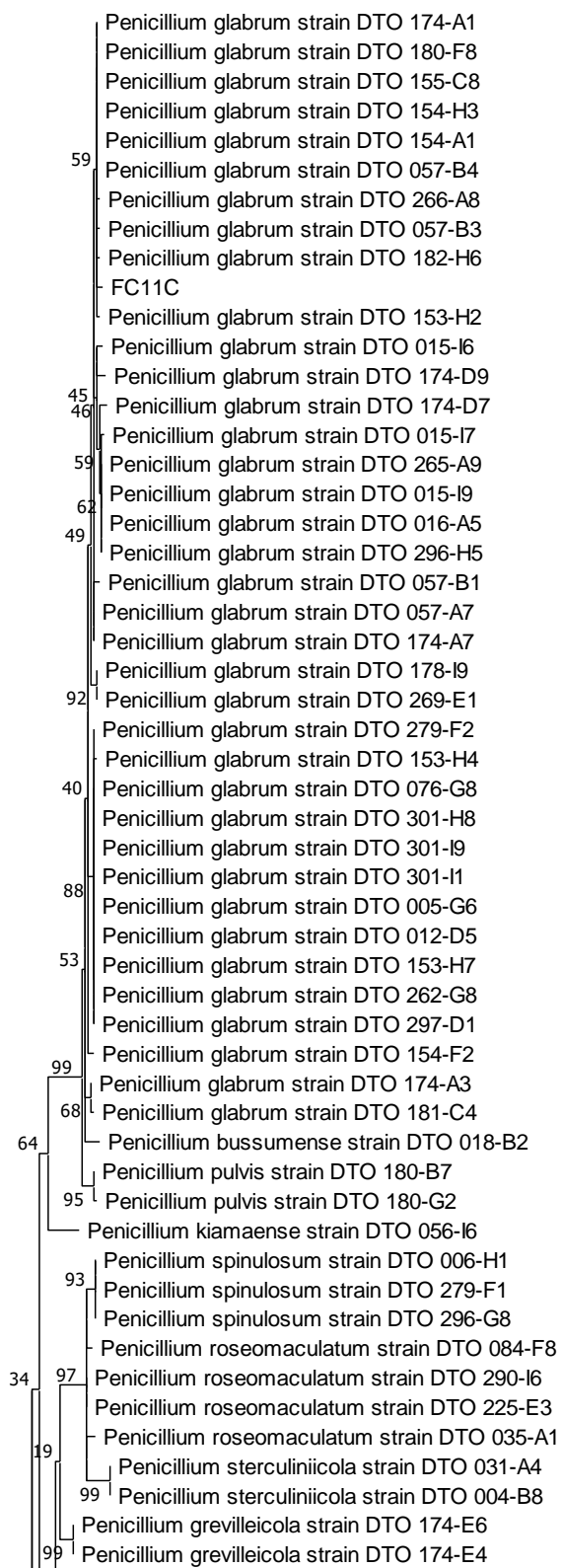


Figura 6. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, LSU y BenA de 21 especies de *Chaetomium* y *Achaetomium strumarium* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos.



(Continúa...)

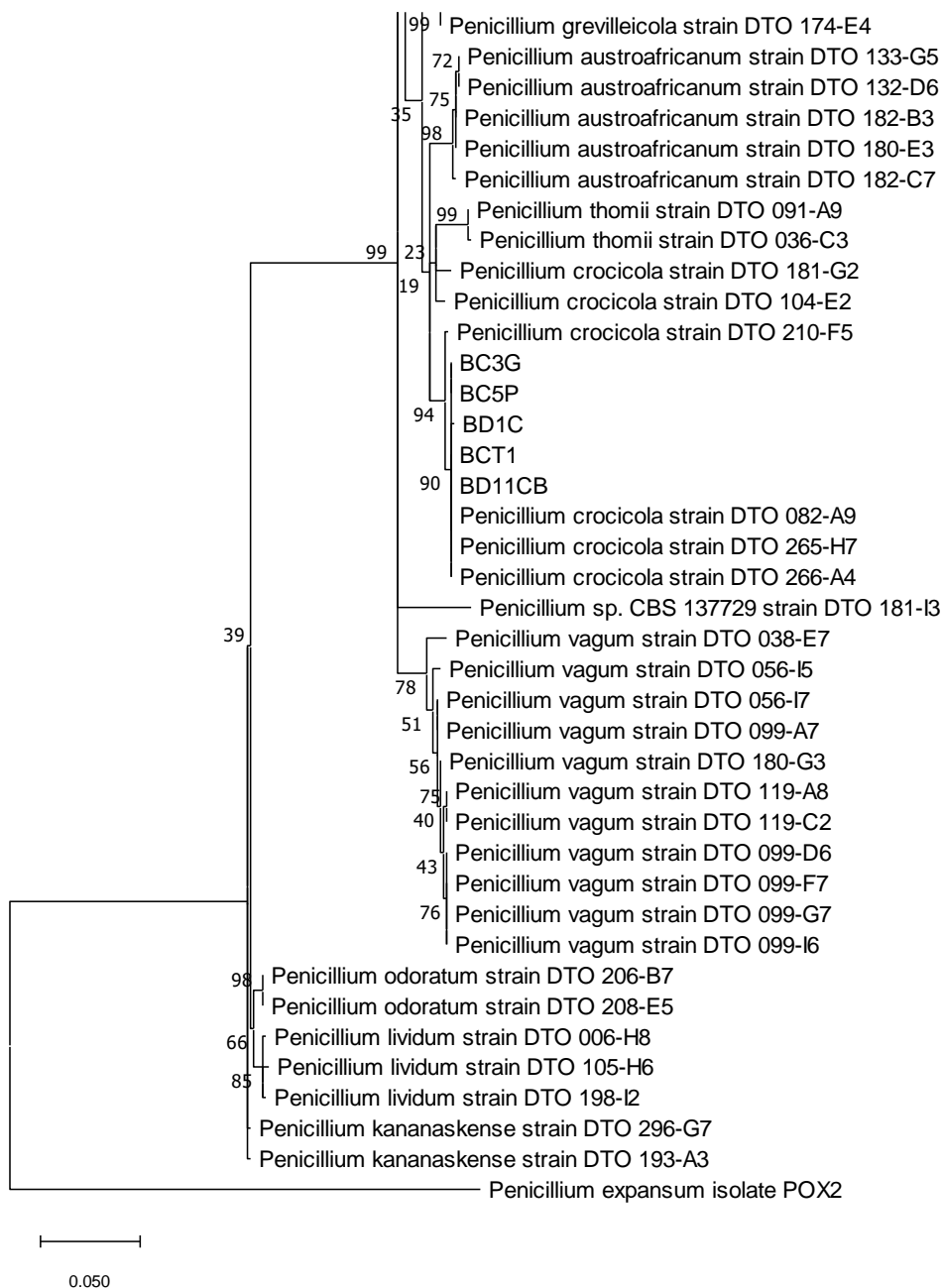


Figura 7. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, CMD y BenA de 15 especies de *Penicillium* sección Aspergilli con *Penicillium expansum* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos.

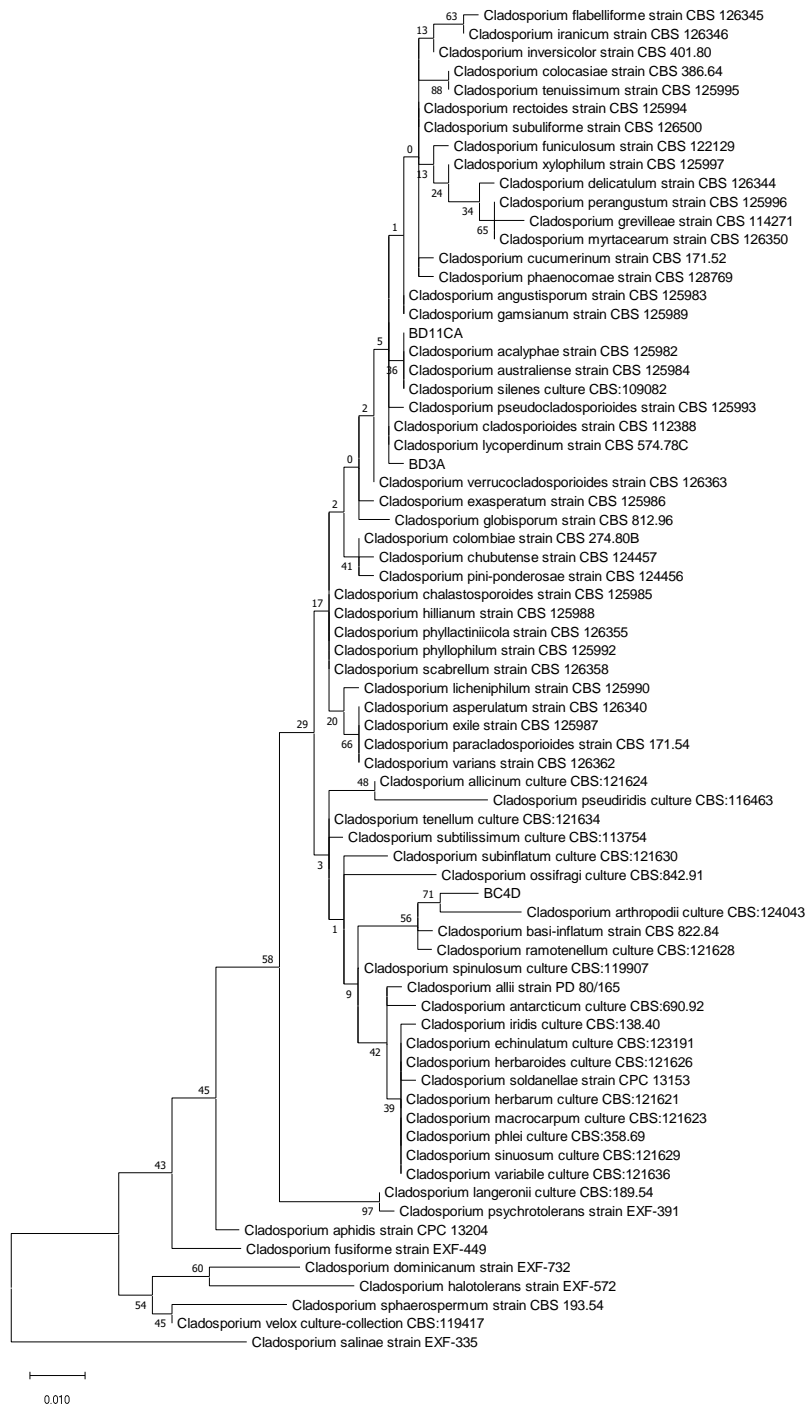
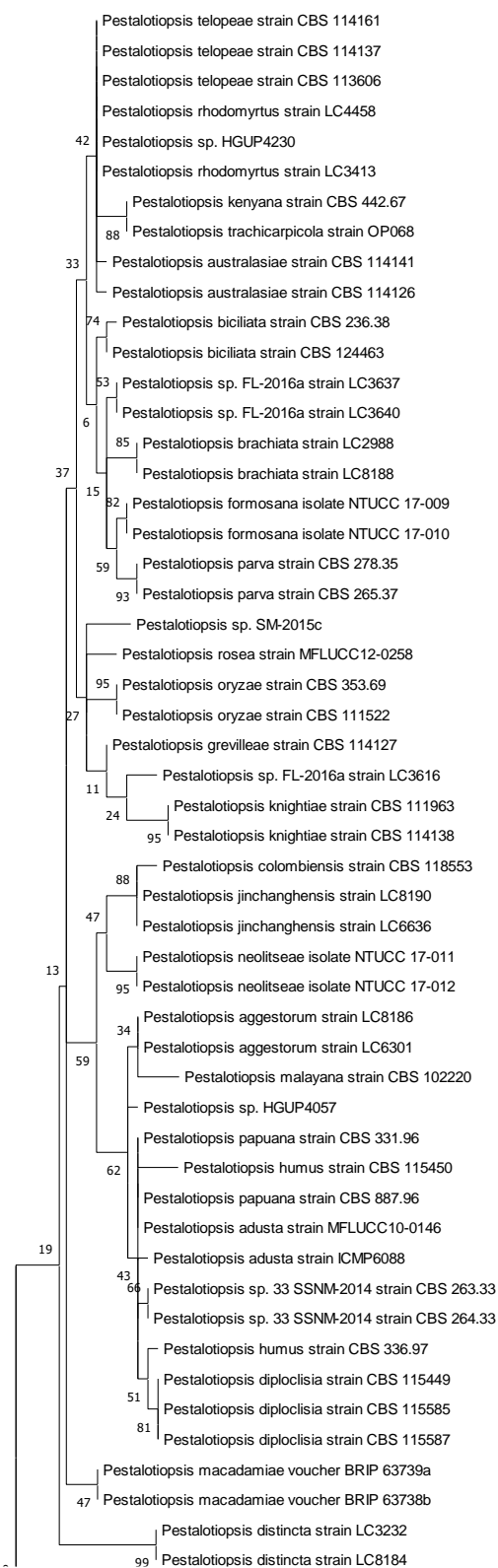


Figura 8. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS y TEF de 69 especies de *Cladosporium* con *Cladosporium salinae* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos



(Continúa...)

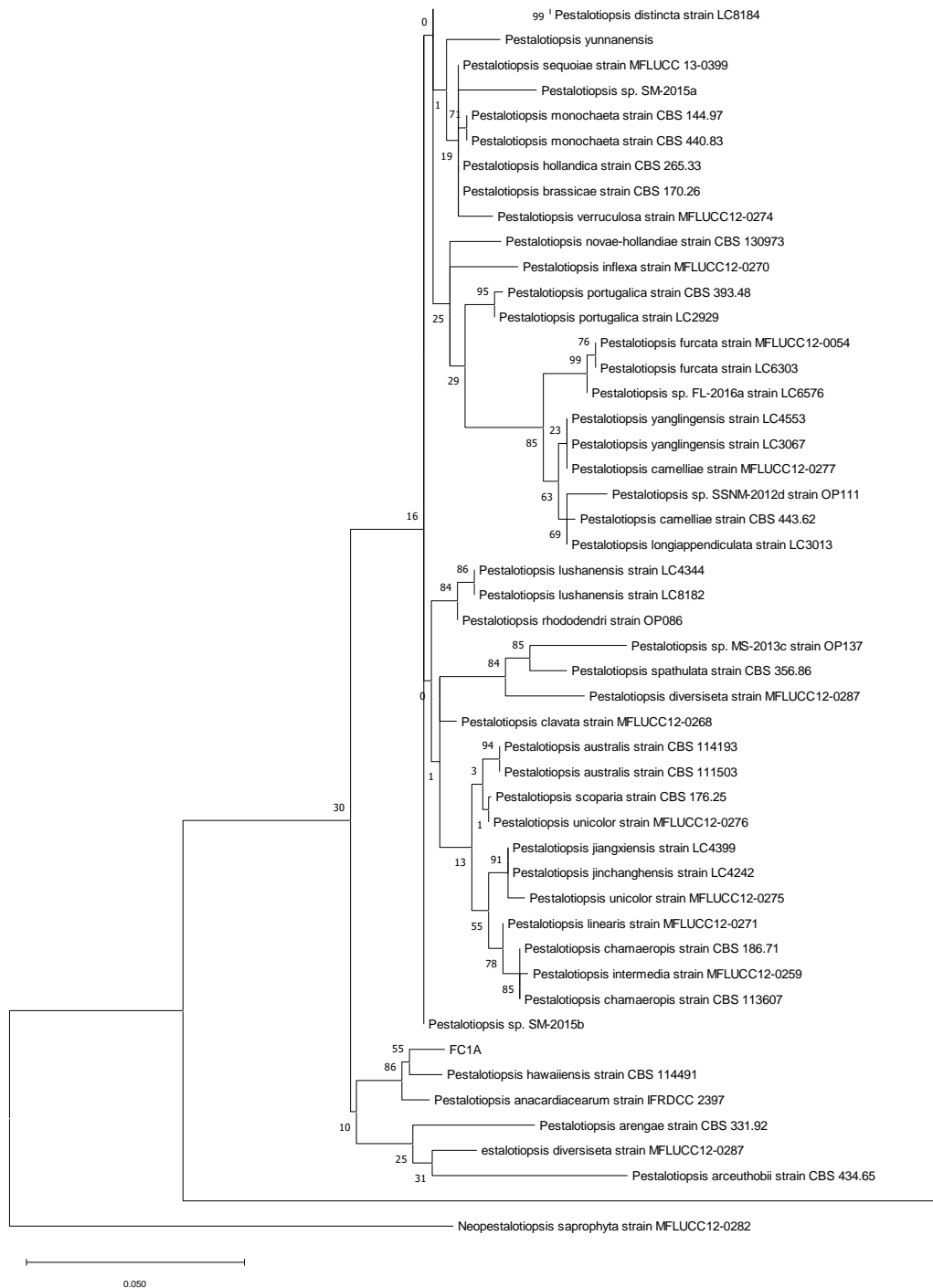
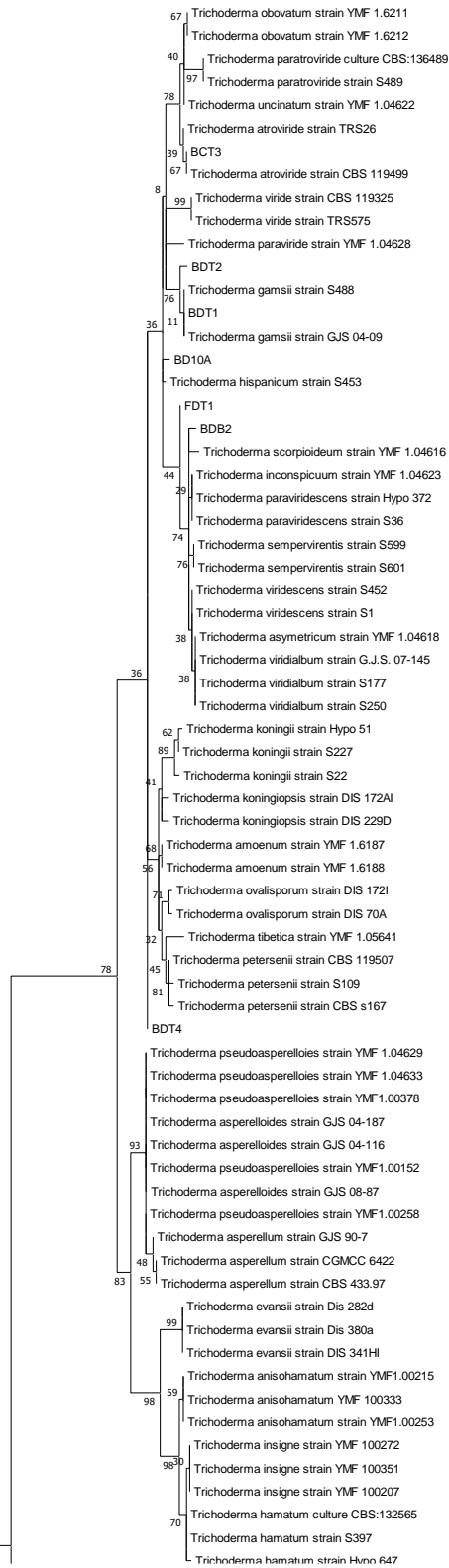


Figura 9. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS y TEF de 68 especies de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis saprophyta* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos.



(Continúa...)

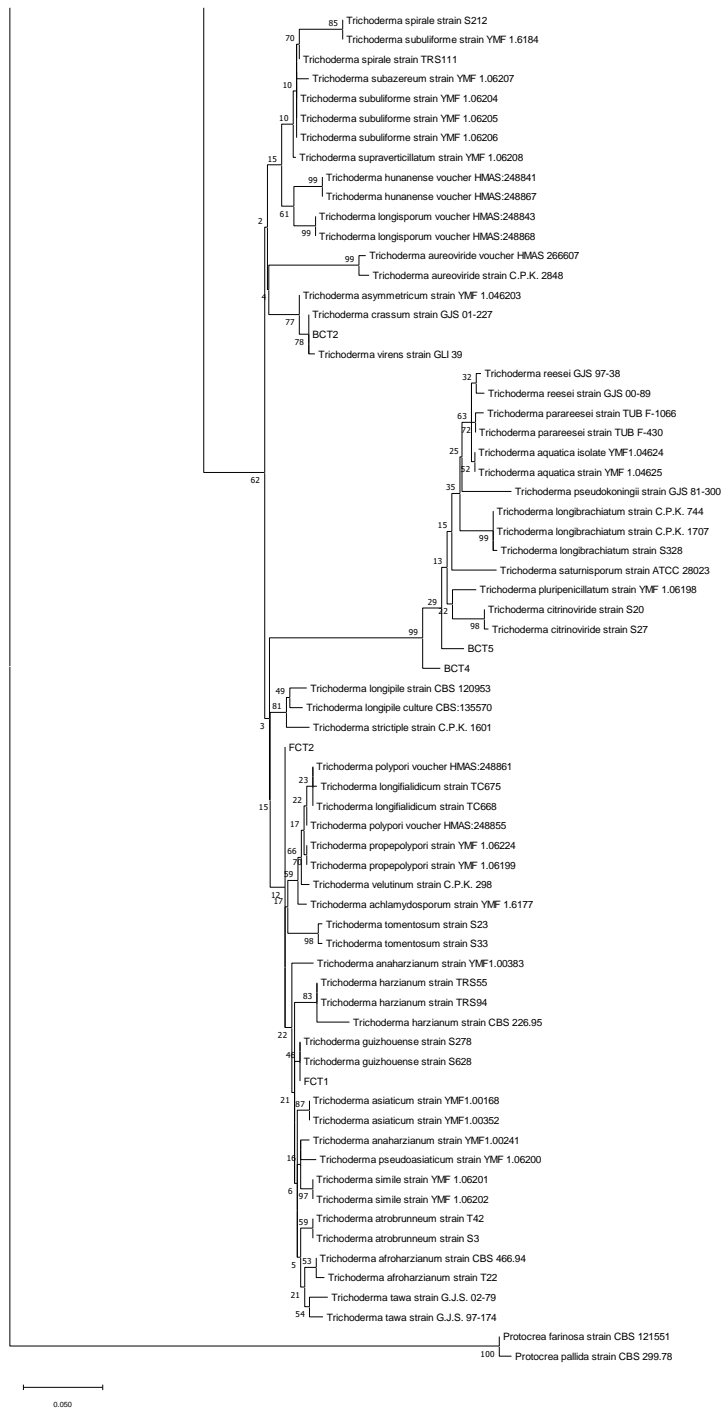


Figura 10. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS, TEF y RPB2 de 63 especies de *Trichoderma* y *Protocrea farinosa* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos.

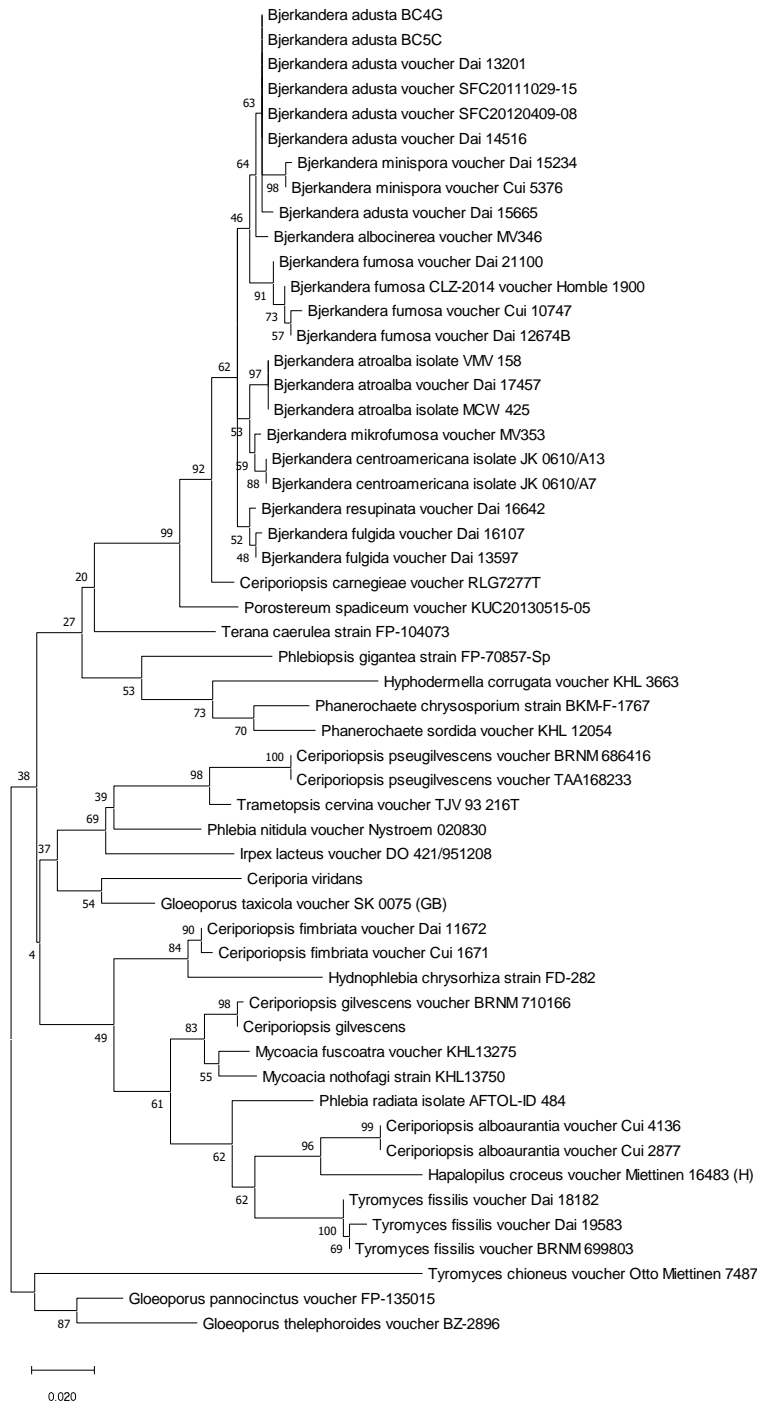
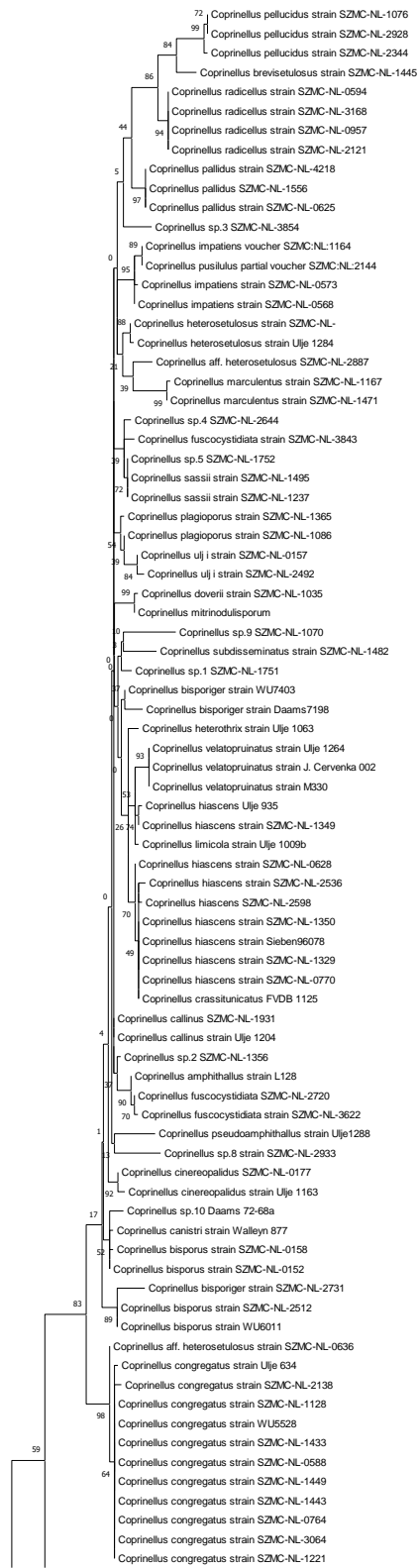


Figura 11. Árbol filogenético elaborado con secuencias concatenadas de los genes ITS y LSU de 9 especies de *Bjerkandera* y *Ceriporia viridans* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos.



(Continúa...)

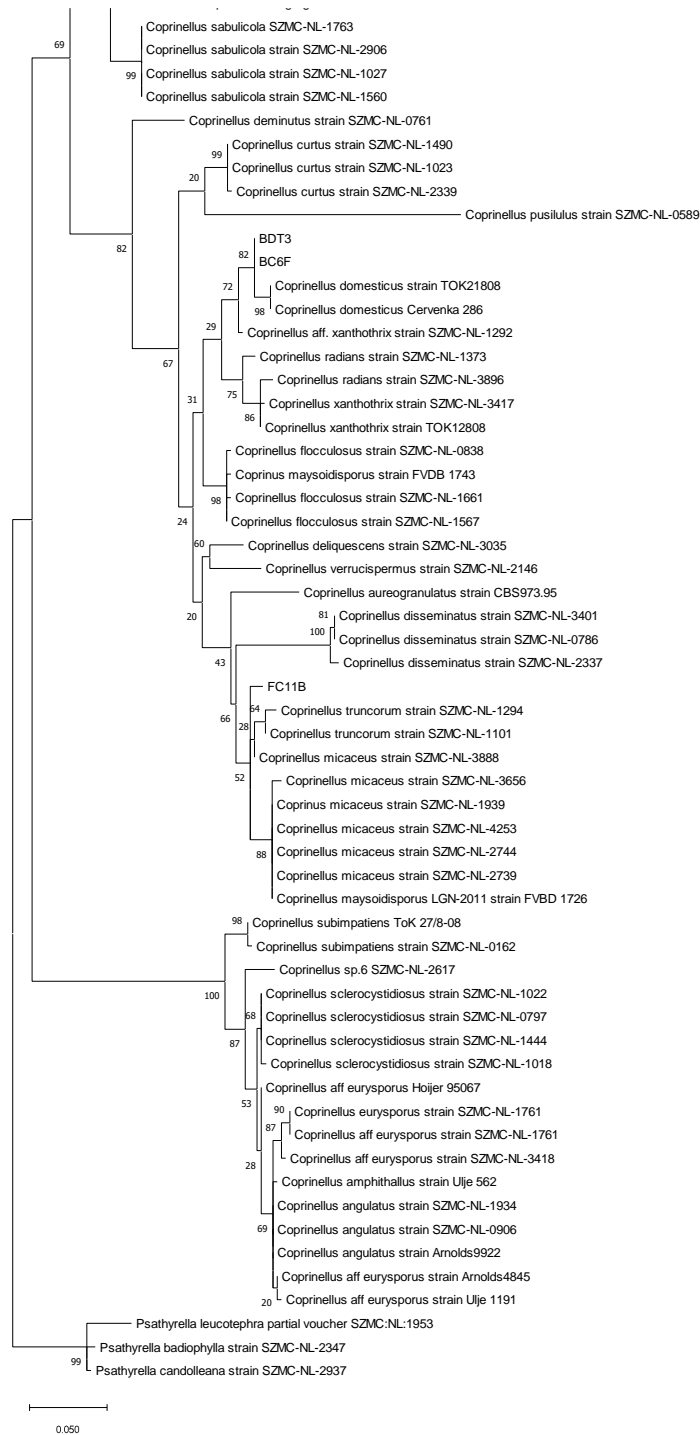


Figura 12. Árbol filogenético elaborado con secuencias de la región ITS de 66 especies de *Coprinellus* con *Psathyrella leucotephra* como outgroup. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Maximum likelihood, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. El valor de Bootstrap es indicado en los nodos.

APÉNDICE II

Cuadro 1. Detalle estadísticas de la prueba Tukey, comparando las medias de PICR (%) de aislados de *Botrytis cinerea* resistentes a boscalid contra especies no patogénicas obtenidas desde flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless durante la temporada 2020-2021 en Chile.

Análisis de la varianza

cepa	dia	Variable	N	R ²	Aj	CV
Rboscalid	7	PICR	76	0,90	0,84	542,5

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	72151,59	27	2672,28	15,33	<0,0001
aislado	72151,59	27	2672,28	15,33	<0,0001
Error	8367,75	48	174,33		
Total	80519,34	75			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=45,44915

Error: 174,3282 gl: 48

aislado	Medias	n	E.E.																	
bc5b	-41,07	3	7,62	A																
fc10a3	-38,75	3	7,62	A																
fd3c	-38,27	3	7,62	A																
bc3b	-34,05	2	9,34	A																
fc10a1	-32,53	3	7,62	A																
bd2a	-30,88	2	9,34	A																
bdt3s	-30,32	3	7,62	A																
bdt3m	-28,84	2	9,34	A																
bc4f	-26,02	2	9,34	A	B															
fd3a1	-25,79	3	7,62	A	B															
bc1a	-23,78	3	7,62	A	B	C														
bc6a	-22,64	3	7,62	A	B	C	D													
fd1a	-21,84	3	7,62	A	B	C	D													
fd3a	-18,52	2	9,34	A	B	C	D													
fc11a	-10,68	3	7,62	A	B	C	D	E												
control	-2,45	3	7,62	A	B	C	D	E	F											
bct4	-1,52	3	7,62	A	B	C	D	E	F	G										
bct2	17,24	3	7,62		B	C	D	E	F	G	H									
fdt1	17,59	3	7,62		B	C	D	E	F	G	H									
bdt2	18,56	3	7,62		B	C	D	E	F	G	H									
bct5	20,36	3	7,62			C	D	E	F	G	H									
bc1c	22,19	2	9,34				D	E	F	G	H	I								
fct2	30,43	3	7,62					E	F	G	H	I								
bdb2	34,89	3	7,62						F	G	H	I								
fct1	39,44	3	7,62						F	G	H	I								
bct3	43,27	2	9,34							G	H	I								
bdt1	46,33	2	9,34								H	I								
bdt4	67,18	3	7,62									I								

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 2. Detalle de las estadísticas de la prueba Tukey, comparando las medias de PICR (%) de aislados de *Botrytis cinerea* resistentes a fenhexamid contra especies no patogénicas obtenidas desde flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless durante la temporada 2020-2021 en Chile.

Análisis de la varianza

cepa	dia	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rfenhexamid	7	PICR	82	0,86	0,79	559,95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	105393,84	27	3903,48	11,99	<0,0001
aislado	105393,84	27	3903,48	11,99	<0,0001
Error	17579,82	54	325,55		
Total	122973,66	81			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=58,74216

Error: 325,5522 gl: 54

aislado Medias n E.E.

bc5b	-45,11	3	10,42	A																	
fc10a1	-44,73	3	10,42	A	B																
bd2a	-43,58	3	10,42	A	B																
fc10a3	-42,92	3	10,42	A	B																
fd3c	-38,58	3	10,42	A	B	C															
bc3b	-35,22	3	10,42	A	B	C															
bc1a	-34,82	3	10,42	A	B	C															
bc4f	-34,23	2	12,76	A	B	C															
bdt3m	-33,82	3	10,42	A	B	C															
fd3a1	-31,24	3	10,42	A	B	C	D														
bc6a	-29,89	3	10,42	A	B	C	D	E													
fd1a	-25,05	3	10,42	A	B	C	D	E	F												
bdt3s	-24,69	3	10,42	A	B	C	D	E	F												
fc11a	-12,78	3	10,42	A	B	C	D	E	F	G											
fd3a	-12,46	3	10,42	A	B	C	D	E	F	G											
control	-1,40	3	10,42	A	B	C	D	E	F	G	H										
bct4	1,74	3	10,42	A	B	C	D	E	F	G	H	I									
fdt1	9,94	3	10,42	A	B	C	D	E	F	G	H	I									
bdt2	13,86	3	10,42		B	C	D	E	F	G	H	I	J								
bct5	17,92	3	10,42			C	D	E	F	G	H	I	J								
bdb2	25,21	3	10,42				D	E	F	G	H	I	J								
fst1	27,78	3	10,42					E	F	G	H	I	J								
bc1c	28,87	2	12,76						F	G	H	I	J								
fct2	39,16	3	10,42							G	H	I	J								
bdt1	48,81	3	10,42								H	I	J								
bct3	56,17	3	10,42									H	I	J							
bct2	58,98	3	10,42										I	J							
bdt4	72,22	3	10,42											J							

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 3. Detalle estadísticas de la prueba Tukey, comparando las medias de PICR (%) de aislados de *Botrytis cinerea* sensible contra especies no patogénicas obtenidas desde flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless durante la temporada 2020-2021 en Chile.

Análisis de la varianza

cepa	día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
sensible	7	PICR	81	0,85	0,77	235,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	116193,65	27	4303,47	10,87	<0,0001
aislado	116193,65	27	4303,47	10,87	<0,0001
Error	20976,58	53	395,78		
Total	137170,23	80			

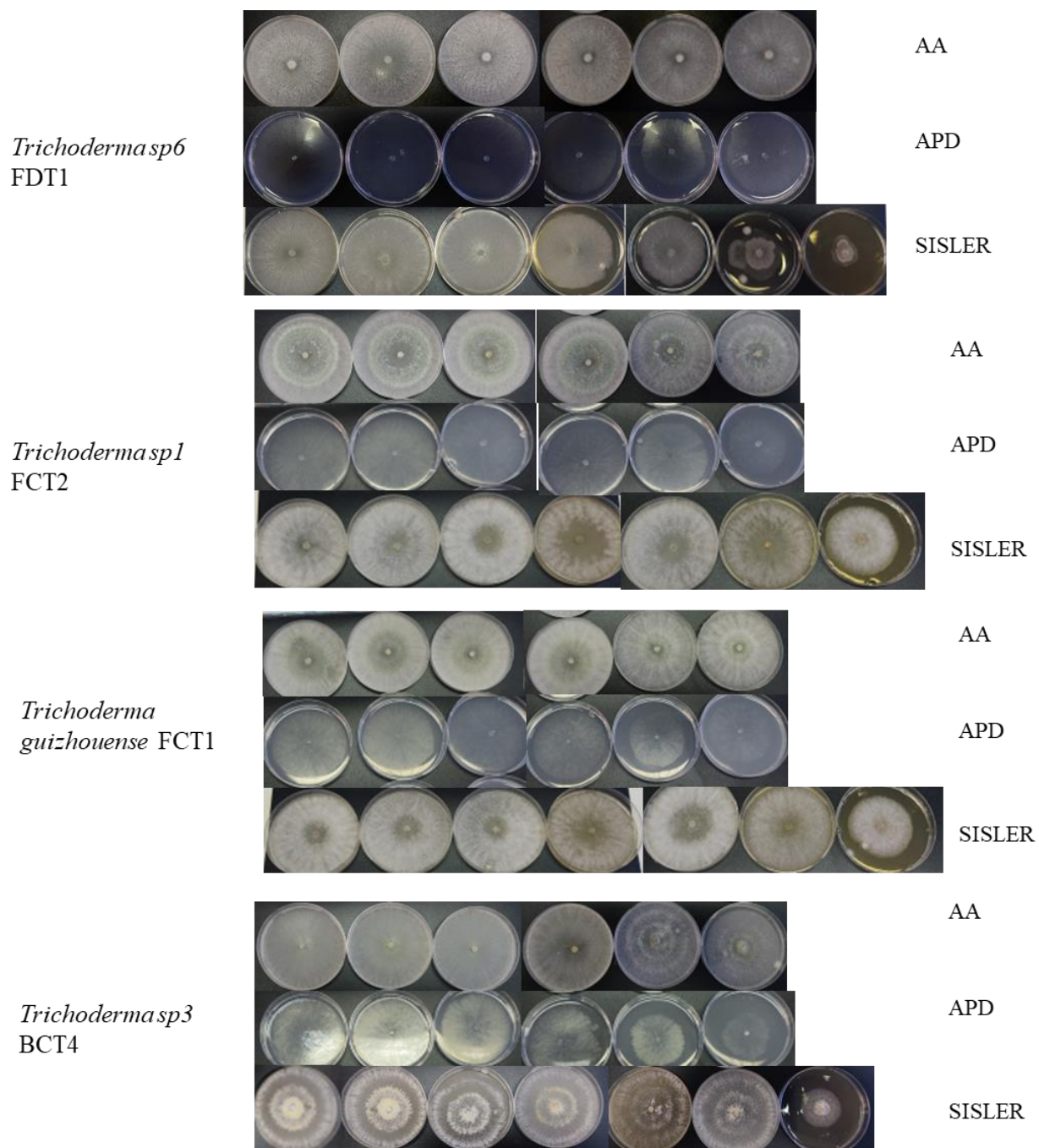
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=65,38958

Error: 395,7844 gl: 53

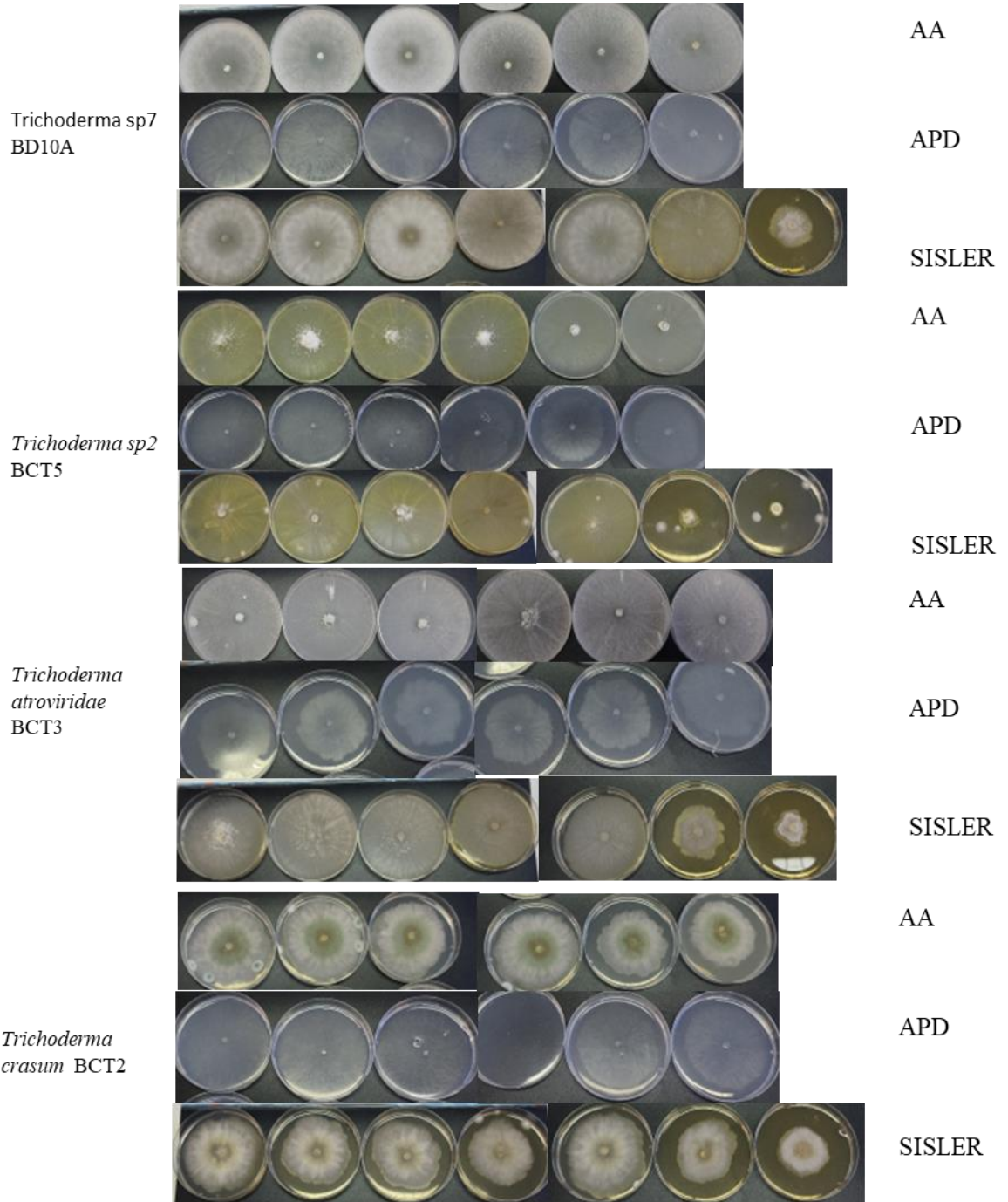
aislado	Medias	n	E.E.						
fc10a3	-31,38	3	11,49	A					
bc4f	-30,45	3	11,49	A					
bc5b	-29,83	2	14,07	A					
bc3b	-28,13	3	11,49	A					
bdt3m	-27,21	3	11,49	A					
fc10a1	-27,02	3	11,49	A					
bc6a	-26,23	3	11,49	A					
bc1a	-24,70	3	11,49	A					
bd2a	-23,04	3	11,49	A					
fd3c	-22,70	3	11,49	A					
fd3a1	-20,84	3	11,49	A					
bdt3s	-20,61	3	11,49	A					
fd3a	-9,10	3	11,49	A	B				
fd1a	-6,20	2	14,07	A	B	C			
fc11a	-5,10	3	11,49	A	B	C	D		
control	0,51	3	11,49	A	B	C	D		
bct4	9,73	3	11,49	A	B	C	D	E	
fdt1	13,44	3	11,49	A	B	C	D	E	
bc1c	20,17	3	11,49	A	B	C	D	E	
bct5	31,51	3	11,49	A	B	C	D	E	
bdb2	46,90	3	11,49		B	C	D	E	F
fct1	49,71	3	11,49		B	C	D	E	F
fct2	53,48	3	11,49		B	C	D	E	F
bct2	56,29	3	11,49			C	D	E	F
bdt2	59,65	3	11,49				D	E	F
bct3	68,09	3	11,49					E	F
bdt1	72,97	3	11,49					E	F
bdt4	100,00	2	14,07						F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

APÉNDICE III



(Continúa...)



(Continúa...)

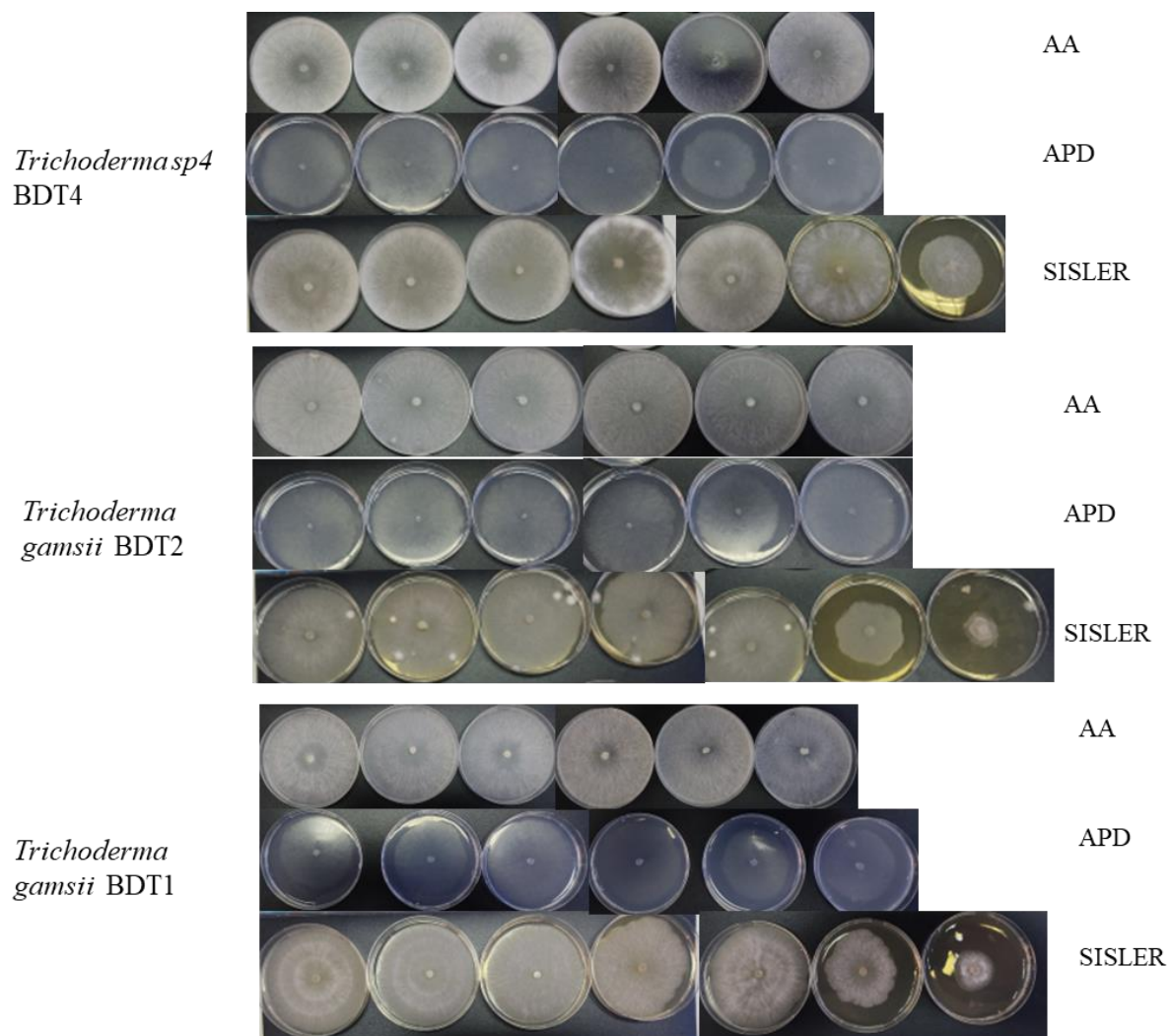


Figura 1. Fotos de diferentes especies de *Trichoderma* obtenidas desde flores y bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless de la temporada 2020-2021 en Chile, evaluadas en crecimiento micelial en medios enmendados con concentraciones crecientes de boscalid (AA, APD) y fenhexamid (SISLER).