

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN
FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Profesional de Biología Microbiología

**Evaluación de metabolitos extracelulares de *Trichoderma* spp.
para el control de *Botrytis cinerea* causante de la
“podredumbre gris” en uva de mesa (*Vitis vinifera*)**

TESIS

Presentada por:

Bach. Jose Fernando Sandoval Niebles

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIOLÓGO

TACNA – PERÚ

2025

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 446

En la ciudad de Tacna, en el auditorium de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 10:00 horas del día 20 de junio del 2025, estando presente el jurado calificador nominado con Resolución de Facultad N° 11309 – 2025 FACI – UNJBG, conformado por los siguientes docentes:

DR. ROBERTO CASTELLANOS CABRERA (PRESIDENTE)

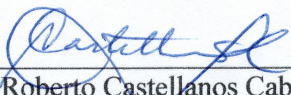
DRA. ANGELA VERÓNICA CHOQUE MIRANDA (SECRETARIO)

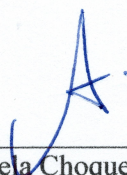
MGR. ROSALÍA CALLOHUARI QUISPE (VOCAL)

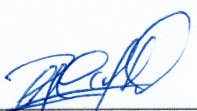
Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente, y del mismo modo se informa al Bachiller que el acto de sustentación constara de dos partes: (I) exposición y sustentación de la tesis, (II) absolución de preguntas del jurado. Todo ello en un tiempo no mayor a 60 minutos ni menor a 30 minutos. A continuación, el presidente del jurado instó al Bachiller: JOSE FERNANDO SANDOVAL NIEBLES a exponer la Tesis titulada: **Evaluación de metabolitos extracelulares de *Trichoderma* spp. para el control de *Botrytis cinerea* causante de la “podredumbre gris” en uva de mesa (*Vitis vinifera*)**, para optar el Título Profesional de BIÓLOGO – MICROBIÓLOGO.

Siendo las 11:00 horas, el tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador, terminando este proceso, se invitó al público presente a abandonar la sala de sustentación para que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: APROBADO POR UNANIMIDAD, con nota de DIECISIETE (17), de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann – Tacna.

Siendo las 11:35 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.


Dr. Roberto Castellanos Cabrera
Presidente


Dra. Angela Choque Miranda
Secretario


Mgr. Rosalía Callohuari Quispe
Vocal


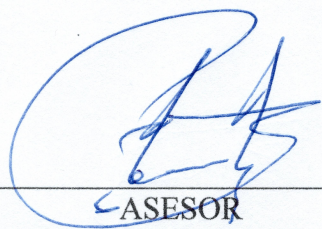
CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Daladier Miguel Castillo Cotrina, en mi calidad de asesor de la tesis titulada: “Evaluación de metabolitos extracelulares de *Trichoderma* spp. para el control de *Botrytis cinerea* causante de la “podredumbre gris” en uva de mesa (*Vitis vinifera*)”, elaborada por el bachiller Jose Fernando Sandoval Niebles, de la Escuela Profesional de Biología - Microbiología, hago constar lo siguiente:

Luego de realizar el análisis de similitud mediante el software **Turnitin**, la tesis presentó un **8 %** de similitud general. En tal sentido, **CERTIFICO QUE LA SIMILITUD** se encuentra dentro del nivel **PERMITIDO**, por lo cual se puede continuar con los trámites correspondientes y proceder con su publicación en el repositorio institucional.

Se expide la presente constancia para los fines que estime conveniente.

Tacna, 26 de junio del 2025.



ASESOR

Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
DNI: 18867330



TESISTA

Bach. Jose Fernando Sandoval Niebles
DNI: 47024087

DEDICATORIA

Al pequeño Jose, de 6 años,
que cuando grande quería ser artista,
vendedor de helados y científico...
¡una de tres no está mal!

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Dr. Daladier Castillo Cotrina, quien me brindó oportunidades de estudio y, a la vez, me brindó valiosos consejos para culminar este trabajo.

A mis profesores, el Dr. José Luis Henríquez Sáez, el Dr. Alan Zamorano y la Dra. Liduvina Sulca, quienes me motivaron a involucrarme en el fascinante mundo de la Fitopatología, una valiosa disciplina que tanto necesita nuestro país.

A mis colegas, Jose Miguel, Pablo Sandoval y Jhonny Paredes, quienes fueron un excelente cohete cada vez que quise escapar. A mis compañeros, Carlos Tala y Ssack, quienes me enseñaron que una agradable amistad no necesita demasiadas palabras. A Williams Lazarte, quien, desde donde esté, sabe que, sin su ayuda y amistad, mis años en la carrera habrían sido muchos más. Su recuerdo sigue presente en cada logro que alcance. Muy especialmente a Marcelo, Claudio, Tuco, Nacha e Isadora, quienes lograron encender mi luz en la más profunda oscuridad. A Juan López, Joao Santos, Carlos Quispe y Wilson Tichahuanca, quienes, con su apoyo sincero, me acompañaron a lo largo de esta tesis. Y a mi familia, pues con ellos aprendí más sobre mí mismo.

CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del problema	4
1.2. Hipótesis.....	6
1.3. Justificación.....	6
1.4. Objetivos	8
1.4.1. Objetivo general.....	8
1.4.2. Objetivos específicos.....	8
II. MARCO TEÓRICO	9
2.1. Antecedentes	9
2.2. Fundamento teórico	15
2.2.1. Control biológico	15

2.2.2. Características y mecanismos antifúngicos de <i>Trichoderma</i> spp.....	19
2.2.3. Biología y patogenicidad de <i>Botrytis cinerea</i>	25
2.2.4. Metabolitos extracelulares de <i>Trichoderma</i> spp.	31
2.2.5. Evaluación de la eficacia antifúngica	36
2.2.6. Identificación molecular de <i>Trichoderma</i>	42
III. MARCO METODOLÓGICO	44
3.1. Tipo y diseño de estudio	44
3.2. Material biológico.....	45
3.3. Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	46
3.4. Caracterización morfológica y fisiológica de <i>Trichoderma</i> spp.	47
3.4.1. Cultivo monospórico	47
3.4.2. Evaluación de la tasa de crecimiento	48
3.4.3. Caracterización cultural y microscópica	49
3.5. Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i>	49
3.6. Identificación molecular y análisis filogenético multilocus de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Botrytis cinerea</i>	51
3.6.1. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación de loci <i>g3pdh</i> , <i>hsp60</i> y <i>rpb2</i> de <i>Botrytis cinerea</i>	51
3.6.2. Análisis filogenético multilocus de <i>Botrytis cinerea</i>	54

3.6.3. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación de loci ITS, tef1 y rpb2 de <i>Trichoderma</i> spp.....	61
3.6.4. Análisis filogenético multilocus de <i>Trichoderma</i> spp.....	64
3.7. Prueba de antibiosis	74
3.8. Prueba de micoparasitismo	74
3.9. Antagonismo potencial	76
3.10. Efecto inhibitorio de los metabolitos volátiles (MVs).....	76
3.10.1. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i>	76
3.10.2. Efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de los MVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i>	77
3.11. Efecto inhibitorio de los metabolitos no volátiles (MNVs)	78
3.11.1. Obtención de MNVs de <i>Trichoderma</i> spp.....	78
3.11.2. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i>	79
3.11.3. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i>	79
3.11.4. Efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i>	80
3.12. Análisis estadístico	81
IV. RESULTADOS.....	82

4.1. Aislamiento y caracterización de <i>Trichoderma</i> spp.	82
4.1.1. Aislamiento de cepas nativas.....	82
4.1.2. Identificación molecular y análisis filogenético	84
4.1.3. Caracterización morfológica y fisiológica.....	89
4.2. Aislamiento y caracterización de <i>Botrytis cinerea</i>	109
4.2.1. Aislamiento del patógeno	109
4.2.2. Identificación molecular y análisis filogenético	113
4.3. Evaluación del potencial biocontrolador de <i>Trichoderma</i> spp.....	116
4.3.1. Pruebas de antagonismo directo.....	116
4.3.2. Antagonismo potencial.....	127
4.3.3. Efecto de metabolitos volátiles (MVs).....	130
4.3.4. Efecto de metabolitos no volátiles (MNVs)	140
V. DISCUSIÓN.....	167
VI. CONCLUSIONES.....	183
VII. RECOMENDACIONES.....	185
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	186
IX. ANEXOS.....	242

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores específicos utilizados para la amplificación de los loci <i>g3pdh</i> , <i>hsp60</i> y <i>rpb2</i>	53
Tabla 2. Números de acceso a Genbank de cepas utilizadas para inferencia filogenética de <i>Botrytis</i>	56
Tabla 3. Cebadores específicos utilizados para la amplificación de los loci ITS, <i>tef1</i> y <i>rpb2</i>	63
Tabla 4. Números de acceso a Genbank de cepas utilizadas para inferencia filogenética de <i>Trichoderma</i>	66
Tabla 5. Información de aislamientos representativos de <i>Trichoderma</i> spp.	83
Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> BO01 por cepas de <i>Trichoderma</i> en ensayo de antibiosis.....	118
Tabla 7. Porcentaje de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> BO01	121
Tabla 8. Antagonismo potencial de cepas de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> BO01	128
Tabla 9. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MVs de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	132
Tabla 10. Efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de los MVs de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	135

Tabla 11. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01 a diferentes concentraciones	143
Tabla 12. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> BO01 por MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. y tebuconazol a diferentes concentraciones	145
Tabla 13. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i> BO01 a diferentes concentraciones	150
Tabla 14. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> sobre la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i> BO01 por MNVs de <i>Trichoderma</i> spp., y tebuconazol a diferentes concentraciones.....	152
Tabla 15. Efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> en bayas de uva de mesa variedad Red Globe	157
Tabla 16. Porcentaje de inhibición <i>in vivo</i> de <i>Botrytis cinerea</i> BO01 por MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. y tebuconazol a diferentes concentraciones	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos clave del control biológico de enfermedades fúngicas en plantas por hongos antagonistas	18
Figura 2. Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Rhizoctonia solani</i> en ensayos de confrontación dual tras 10 días de incubación.	24
Figura 3. Racimo de uvas de la variedad Trincadeira en la etapa EL33 afectado por <i>Botrytis cinerea</i>	30
Figura 4. Representación gráfica del sistema empleado para evaluación del impacto de los metabolitos volátiles	32
Figura 5. Estructura química de metabolitos no volátiles de <i>Trichoderma asperellum</i> IMI 393899 y <i>Trichoderma atroviride</i> TS.....	34
Figura 6. Árbol filogenético inferido por análisis bayesiano a partir de secuencias concatenadas de ITS, <i>rpb2</i> y <i>tefl</i>	87
Figura 7. Caracterización morfológica de <i>Trichoderma afroharzianum</i>	92
Figura 8. Caracterización morfológica de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	96
Figura 9. Caracterización morfológica de <i>Trichoderma</i> sp.....	101
Figura 10. Caracterización morfológica de <i>Trichoderma paratroviride</i>	104
Figura 11. Caracterización morfológica de <i>Trichoderma asperelloides</i>	108
Figura 12. Caracterización morfológica de <i>Botrytis cinerea</i>	110

Figura 13. Curva de inhibición dosis-respuesta de <i>Botrytis cinerea</i> frente al fungicida tebuconazol, con valores de EC ₅₀ e EC ₉₀	112
Figura 14. Árbol filogenético inferido por análisis de máxima verosimilitud a partir de secuencias concatenadas de <i>g3pdh</i> , <i>hsp60</i> y <i>rpb2</i>	115
Figura 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> BO01 por cepas de <i>Trichoderma</i> en ensayo de antibiosis.....	119
Figura 16. Porcentaje de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	122
Figura 17. Actividad antagonista de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Botrytis cinerea</i> BO01 mediante ensayos de antibiosis y micoparasitismo	123
Figura 18. Antagonismo potencial de cepas de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	129
Figura 19. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MVs de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01	133
Figura 20. Efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de los MVs de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01	136
Figura 21. Evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de los MVs de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	138
Figura 22. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01 a diferentes concentraciones	146

Figura 23. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i> BO01 a diferentes concentraciones.....	153
Figura 24. Efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01 en bayas de uva de mesa variedad Red Globe	160
Figura 25. Evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	162

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> BO01 por cepas de <i>Trichoderma</i> en ensayo de antibiosis.	242
Anexo 2. Análisis de varianza para el porcentaje de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> BO01.	242
Anexo 3. Análisis de varianza para el porcentaje de antagonismo potencial de cepas de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	243
Anexo 4. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de metabolitos volátiles de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	243
Anexo 5. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de metabolitos volátiles de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	244
Anexo 6. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs (30 %) de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	244
Anexo 7. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs (40 %) de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	245
Anexo 8. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs (50 %) de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01.....	245
Anexo 9. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01 a diferentes concentraciones....	246

Anexo 10. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs (30 %) de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i> BO01.	246
Anexo 11. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs (40 %) de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i> BO01.	247
Anexo 12. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs (50 %) de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i> BO01.	247
Anexo 13. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la germinación de conidios de <i>Botrytis cinerea</i> BO01 a diferentes concentraciones.	248
Anexo 14. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de MNVs (30 %) de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01.	248
Anexo 15. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de MNVs (40 %) de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01.	249
Anexo 16. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de MNVs (50 %) de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01.	249
Anexo 17. Análisis de varianza del efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de los MNVs de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Botrytis cinerea</i> BO01 a diferentes concentraciones....	250

RESUMEN

La podredumbre gris, causada por *Botrytis cinerea*, afecta significativamente la producción y poscosecha de uva de mesa. Ante la resistencia a fungicidas sintéticos y sus efectos ambientales, este estudio evaluó el potencial biocontrolador de *Trichoderma* spp. mediante sus metabolitos extracelulares volátiles y no volátiles. Se aislaron 118 cepas de la rizosfera y tejidos vegetales, identificándose molecularmente 10 de ellas, además de *Botrytis cinerea* obtenida de uvas infectadas. El análisis filogenético confirmó a *T. afroharzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. asperelloides*, *T. paratroviride* y *Trichoderma* sp. En el ensayo de antibiosis, *T. afroharzianum* AZEN10 y AZEN20, *T. longibrachiatum* AZEN14 y AZEN17, inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* en un 88,45 %. Por su parte, *T. asperelloides* CA07 y *T. paratroviride* MA02 alcanzaron un 100 % de micoparasitismo. *T. afroharzianum* AZEN10 y AZEN20, *T. asperelloides* CA07 y *T. paratroviride* MA02 destacaron por su antagonismo potencial, alcanzando una inhibición del 94,48 %. Los metabolitos volátiles de *Trichoderma* sp. AZEN06 y TI15 alcanzaron una inhibición del 97,01 % *in vitro* y 75,43 % *in vivo*. Los metabolitos no volátiles al 50 % mostraron una eficacia del 80,81 % en la inhibición del crecimiento, 81,53 % en la germinación de conidios y 55,18 % *in vivo*, destacándose *T. afroharzianum* AZEN20 y AZEN10. Los resultados destacan el potencial de *Trichoderma* como agente de control biológico de *B. cinerea*, ofreciendo una alternativa sostenible al uso de fungicidas químicos.

ABSTRACT

Gray mold, caused by *Botrytis cinerea*, significantly affects the production and postharvest quality of table grapes. Due to the increasing resistance to synthetic fungicides and their environmental impacts, this study evaluated the biocontrol potential of *Trichoderma* spp. through their extracellular metabolites, both volatile and non-volatile. A total of 118 strains were isolated from the rhizosphere and plant tissues, with 10 strains molecularly identified, along with *B. cinerea* isolated from infected grapes. Phylogenetic analysis confirmed the presence of *T. afroharzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. asperelloides*, *T. paratroviride*, and an unidentified *Trichoderma* sp. In the antibiosis assay, *T. afroharzianum* AZEN10 and AZEN20, as well as *T. longibrachiatum* AZEN14 and AZEN17, inhibited the growth of *B. cinerea* by 88,45 %. *T. asperelloides* CA07 and *T. paratroviride* MA02 achieved 100 % mycoparasitism. *T. afroharzianum* AZEN10 and AZEN20, *T. asperelloides* CA07, and *T. paratroviride* MA02 stood out for their antagonistic potential, reaching an inhibition rate of 94,48 %. Volatile metabolites from *Trichoderma* sp. AZEN06 and TI15 achieved 97,01 % inhibition *in vitro* and 75,43 % *in vivo*. Non-volatile metabolites at a 50 % concentration showed 80,81 % efficacy in growth inhibition, 81,53 % in conidia germination inhibition, and 55,18 % *in vivo*, with *T. afroharzianum* AZEN20 and AZEN10 being the most notable. These results highlight the potential of *Trichoderma* as a biological control agent against *B. cinerea*, offering a sustainable alternative to chemical fungicides.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la uva de mesa (*Vitis vinifera*) es un cultivo importante que cuenta con alrededor de 10 000 variedades, de las cuales solo 33 cubren aproximadamente el 50 % de la superficie mundial de viñedos (OIV, 2017; Adrian *et al.*, 2024). En el Perú, el cultivo de uva de mesa se ha transformado en una de las actividades agrícolas más relevantes, alcanzando una exportación de 562 093 toneladas en la temporada 2024 – 2025, lo que representa un incremento del 12,76 % respecto a 2023 – 2024. Las principales variedades comercializadas internacionalmente son Sweet Globe, Red Globe y Allison, exportadas entre los meses de octubre y abril, y enviadas mayoritariamente a Estados Unidos, países europeos y México (CIEN-ADEX, 2024; SENASA, 2025a). Dado que durante el transporte deben recorrerse largas distancias para llegar a los mercados de destino, el tratamiento de conservación en frío (~1,1 °C) es un factor crucial (SENASA, 2014). A pesar de estas condiciones, es frecuente el desarrollo de diversas pudriciones provocadas por hongos fitopatógenos durante el almacenaje.

Diversas enfermedades causadas por fitopatógenos pueden afectar a los cultivos de uva de mesa. Mondello *et al.* (2018), Ye *et al.* (2021) y Bustamante *et al.* (2022) mencionan que la muerte regresiva de *Eutypa*, la muerte regresiva de *Botryosphaeria*, la muerte regresiva de *Phomopsis*, la esca y el pie negro están asociadas a las enfermedades del tronco de la vid. Además, se ha reportado que los

cultivos de uva de mesa, tanto en etapas de precosecha como de poscosecha, pueden ser atacados por *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum* y *Mucor racemosus* (Murray *et al.*, 2019). Entre ellos, *B. cinerea* destaca por causar las mayores pérdidas en poscosecha, al provocar la podredumbre gris en uva de mesa y afectar diversos órganos de la planta, como flores, frutos, hojas y brotes (Williamson *et al.*, 2007; Romanazzi *et al.*, 2016; Elad *et al.*, 2016).

La base del manejo de los problemas fitosanitarios en poscosecha se ha centrado, de manera tradicional, en el uso de agroquímicos; sin embargo, su aplicación intensiva, prolongada e indiscriminada ha generado el desarrollo de cepas resistentes de *B. cinerea* (Leroux *et al.*, 1999; Fillinger *et al.*, 2008; Hahn, 2014). En respuesta a ello, se ha intensificado la búsqueda, el desarrollo y la innovación de productos alternativos que presenten efectos ecotoxicológicos mínimos y que sean capaces de ofrecer productos de mayor calidad, con menor presencia de residuos químicos peligrosos para la salud humana (Palou *et al.*, 2008). Entre estas alternativas, la aplicación de agentes de control biológico (ACB) ha destacado por su potencial antagónico, al ser capaces de controlar *B. cinerea* (Wisniewski *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013; Romanazzi *et al.*, 2016).

Actualmente, en el Perú se emplean diversos ACB en las actividades agrícolas de campo. Entre ellos, *Trichoderma* spp. destaca por su uso extendido en el manejo de fitopatógenos. Su aplicación ha demostrado reducir la incidencia de

estas enfermedades en cultivos de uva de mesa, tomate, palto, maíz, entre otros (SENASA, 2025b). El mecanismo de control biológico de estos hongos se basa en la secreción de antibióticos, la competencia por espacio y nutrientes, y la producción de enzimas degradadoras de la pared celular (Wisniewski *et al.*, 1991; Piano *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 2004). Latorre *et al.* (1997) obtuvieron resultados similares en el control de *B. cinerea* en uva de mesa, al analizar dos formulaciones conidiales obtenidas por el método de fermentación líquida de cepas de *Trichoderma harzianum*. Los tratamientos fueron aplicados al inicio de floración, en plena floración y en pinta, y proporcionaron una inhibición estimada del 64,79 % respecto al testigo. Khairy *et al.* (2025) reportaron que un extracto de metabolitos al 70 % de *Trichoderma reesei* T1 logró reducir *Botrytis cinerea* en frutos de tomate. Por su parte, Lisboa *et al.* (2007) evaluaron la eficacia de *T. harzianum* TRIC-30, aplicado mediante pulverización foliar semanal a partir de la primera floración en plantas de tomate, logrando detener el crecimiento de *B. cinerea* en un 46,36 %.

La eficacia del control biológico mediante metabolitos extracelulares producidos por *Trichoderma* spp. ha sido ampliamente demostrada en diversas especies vegetales. Por lo tanto, esta evidencia abre nuevas posibilidades para el uso de extractos fúngicos en el manejo fitosanitario de la uva de mesa, al permitir un efecto fungicida comparable al de los productos químicos convencionales, pero con un enfoque más sostenible, amigable con el medio ambiente y seguro para el consumidor.

1.1. Planteamiento del problema

La “podredumbre gris”, causada por *Botrytis cinerea*, representa uno de los principales desafíos fitosanitarios en el cultivo de uva de mesa (*Vitis vinifera*), ocasionando pérdidas significativas en la producción y poscosecha (Latorre *et al.*, 2015; De Simone *et al.*, 2020). Este fitopatógeno afecta la calidad comercial de las bayas, reduciendo su vida útil y valor en el mercado, especialmente en regiones con condiciones climáticas favorables para su proliferación, como Tacna, Perú. En este contexto, resulta particularmente preocupante debido al crecimiento sostenido que ha tenido la industria vitícola peruana en la última década, consolidando al país como uno de los principales exportadores de uva de mesa a nivel mundial (Montes Ninaquispe *et al.*, 2024; Castillo Sandoval *et al.*, 2024).

Durante décadas, el manejo de *B. cinerea* ha dependido principalmente del uso de fungicidas sintéticos, como el tebuconazol y el fenhexamid, complementados con prácticas agronómicas que, si bien no son suficientes por sí solas, contribuyen a mejorar la eficacia del control. Estos tratamientos se aplican estratégicamente en etapas fenológicas clave, como la floración, el cierre del racimo, el envero y el periodo previo a la cosecha, y suelen intensificarse cuando las condiciones climáticas elevan el riesgo de epidemias (Esterio *et al.*, 2021). Sin embargo, el uso intensivo y prolongado de estos compuestos ha favorecido la aparición de cepas resistentes y ha generado impactos negativos en el equilibrio ecológico, lo que evidencia la necesidad urgente de desarrollar alternativas

sostenibles que ofrezcan eficacia en el control del fitopatógeno sin comprometer la seguridad ambiental (Esterio *et al.*, 2021; Herrera-Défaz *et al.*, 2023). En este contexto, el control biológico emerge como una estrategia prometedora.

Entre los agentes de control biológico, los hongos del género *Trichoderma* destacan por su capacidad antagónica, la cual se manifiesta a través de mecanismos como la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, el micoparasitismo y la inducción de respuestas de defensa en las plantas hospederas (Mukherjee *et al.*, 2022). No obstante, la mayoría de estudios se han enfocado en otros fitopatógenos, existiendo vacíos significativos en la investigación dirigida a *B. cinerea* en uva de mesa (*V. vinifera*), particularmente bajo condiciones *in vivo* y utilizando cepas locales. Asimismo, la elevada variabilidad genética presente en especies de *Trichoderma* hace indispensable una identificación molecular precisa, que permita garantizar la selección de aislamientos con alto potencial biocontrolador (Cai & Druzhinina, 2021); sin embargo, este enfoque sigue siendo limitado en estudios realizados en ecosistemas rizosféricos peruanos.

La falta de soluciones adaptadas a las condiciones específicas de la región de Tacna, sumada a la necesidad de reducir la dependencia de fungicidas sintéticos, justifica explorar el potencial biocontrolador de *Trichoderma* spp. nativos. Esto no solo contribuiría a mitigar las pérdidas económicas, sino también a fortalecer prácticas agrícolas sostenibles alineadas con la demanda global de seguridad

alimentaria y conservación ambiental (Wang *et al.*, 2023). En este marco, se plantea la siguiente interrogante de investigación:

¿En qué medida los metabolitos extracelulares (volátiles y no volátiles) producidos por cepas de *Trichoderma* spp. inhiben el crecimiento micelial, la germinación de conidios y la infección de *Botrytis cinerea* en uva de mesa (*Vitis vinifera*), *in vitro* e *in vivo*?

1.2. Hipótesis

Los metabolitos extracelulares (volátiles y no volátiles) producidos por cepas de *Trichoderma* spp. inhiben significativamente el crecimiento micelial, la germinación de conidios y la infección de *Botrytis cinerea* en uva de mesa (*Vitis vinifera*), *in vitro* e *in vivo*.

1.3. Justificación

La “podredumbre gris”, provocada por *B. cinerea*, es una de las enfermedades más dañinas para el cultivo de uva de mesa, ocasionando pérdidas significativas tanto en la producción como en la poscosecha. Este fitopatógeno, ampliamente distribuido y con una gran capacidad para adaptarse a diferentes condiciones, afecta la calidad comercial de las bayas, reduciendo su vida útil y su valor en el mercado. Este problema podría intensificarse en regiones como Tacna, Perú, donde las condiciones climáticas favorecen su proliferación. Durante años, el control de esta enfermedad se ha basado en el uso de fungicidas sintéticos, pero su aplicación excesiva ha generado cepas resistentes de *B. cinerea* y ha tenido

impactos negativos en los ecosistemas. Ante este panorama, surge la necesidad de desarrollar soluciones sostenibles que sigan siendo efectivas, pero que a la vez protejan el equilibrio ambiental.

Una de las alternativas más prometedoras es el biocontrol, que consiste en utilizar microorganismos antagonistas, como los hongos del género *Trichoderma*. Estos hongos tienen demostrada capacidad para combatir patógenos mediante diversos mecanismos, como la producción de metabolitos volátiles y no volátiles, micoparasitismo y la estimulación de las defensas de las plantas. Aunque ya existen estudios sobre *Trichoderma* frente a otros patógenos, la investigación sobre su acción contra *B. cinerea* en uvas de mesa, especialmente en condiciones *in vivo*, sigue siendo escasa.

Por lo tanto, esta investigación se justifica no solo por la necesidad de encontrar soluciones adaptadas a la situación local de Tacna, sino también por la necesidad de avanzar hacia una agricultura más sostenible, que reduzca la dependencia de productos químicos. Al centrarse en los metabolitos extracelulares de cepas nativas de *Trichoderma*, este estudio busca identificar los mecanismos que puedan inhibir el crecimiento de *B. cinerea*. El objetivo es ofrecer alternativas que no solo mejoren el control de la enfermedad, sino que también contribuyan a la seguridad alimentaria y la conservación ambiental, en respuesta a la creciente demanda global de prácticas agrícolas más sostenibles.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el potencial de los metabolitos extracelulares producidos por cepas de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinerea*, agente causal de la “podredumbre gris” en uva de mesa, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

1.4.2. Objetivos específicos

Aislar e identificar morfológica y molecularmente cepas de *Trichoderma* spp. provenientes de suelos rizosféricos y tejidos vegetales de cultivos de vid y de plantas silvestres, así como aislar e identificar *B. cinerea* a partir de racimos de uva infectados.

Determinar la capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *B. cinerea* mediante ensayos de antibiosis y micoparasitismo *in vitro*.

Determinar el antagonismo potencial de cepas de *Trichoderma* spp. a través de los ensayos de antibiosis y micoparasitismo.

Determinar el efecto inhibitorio de los metabolitos volátiles y no volátiles de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento micelial, la germinación de conidios y la infección de *B. cinerea* en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Geng *et al.* (2022) realizaron el estudio titulado “Potencial de biocontrol de *Trichoderma harzianum* contra *Botrytis cinerea* en plantas de tomate”, con el objetivo de evaluar la eficacia de *Trichoderma harzianum* (TM) como agente de biocontrol contra *Botrytis cinerea* (BC) en tomate, y comprender los mecanismos implicados en dicha interacción. En los ensayos *in vitro*, TM inhibió el crecimiento de BC con una eficacia del 62,05 % al sexto día, ocupando rápidamente el medio de cultivo. En plantas de tomate, la suspensión de esporas de TM logró una inhibición del moho gris del 33,66 % y 69,44 %, dependiendo del tipo de inóculo. Además, TM redujo los niveles de peróxido de hidrógeno y malondialdehído inducidos por BC, mejorando el estado redox de las hojas. También indujo la expresión de genes relacionados con el metabolismo secundario y la defensa, elevando las concentraciones de flavonoides, fenoles y lignina. A nivel fisiológico, disminuyó el cierre estomático y mejoró la fotosíntesis y la actividad de las enzimas RuBisCO y FBPasa. En conclusión, TM potencia la resistencia del tomate frente a *Botrytis cinerea* mediante la activación de mecanismos redox, producción de metabolitos secundarios y regulación del funcionamiento estomático, posicionándose como un agente prometedor en el control biológico.

Fujinawa *et al.* (2020) realizaron el estudio titulado “Control biológico del moho gris y la mancha foliar por *Myrothecium* en begonias”, con el objetivo de evaluar el antagonismo de *Clonostachys rosea* LQC62 y *Trichoderma asperellum* LQC96 frente a *B. cinerea* y *Myrothecium roridum*, así como su aplicación en el manejo de las enfermedades causadas por estos patógenos en el cultivo comercial de begonia. En condiciones controladas *in vitro*, ambos antagonistas produjeron compuestos solubles capaces de inhibir el desarrollo de *B. cinerea*, aunque no se observó el mismo efecto contra *M. roridum*. Además, produjeron compuestos volátiles que redujeron el crecimiento de ambos patógenos. Se observó superposición de colonias, lo que indica actividad hiperparásita, y ambos microorganismos colonizaron los discos foliares. La aplicación previa de los antagonistas redujo la esporulación de los patógenos hasta en un 100 %, y las pulverizaciones foliares semanales con LQC62 disminuyeron la incidencia de moho gris y mancha foliar de *Myrothecium* en el cultivo comercial. En conclusión, *C. rosea* y *T. asperellum* demostraron un alto potencial como agentes de control biológico en el manejo de enfermedades en begonias.

Bello *et al.* (2022) llevaron a cabo el estudio titulado “La micofumigación de arándanos poscosecha con compuestos volátiles de *Trichoderma atroviride* IC-11 es una herramienta prometedora para controlar las pudriciones causadas por *Botrytis cinerea*”, con el objetivo de evaluar el potencial de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por *Trichoderma atroviride* IC-11 para controlar *B.*

cinerea en arándanos durante el almacenamiento poscosecha. Los VOCs inhibieron casi por completo el crecimiento de *B. cinerea in vitro*, destacando el compuesto 6-pentil- α -pirona (6PP) como el más abundante, cuyo efecto antifúngico fue confirmado en ensayos individuales. En arándanos inoculados y almacenados a 20 °C durante 14 días, la incidencia de moho gris fue del 100 % sin tratamiento, mientras que en frutos expuestos a los VOCs se redujo al 17 %. A 4 °C durante 31 días, la incidencia se redujo del 82 % al 11 %. Además, los VOCs inhibieron el crecimiento micelial y la germinación de conidios, y causaron vacuolación y deterioro de las hifas por interacción directa con su superficie. También se observó una citotoxicidad selectiva del 6PP contra *B. cinerea*, sin afectar células intestinales humanas en concentraciones eficaces. En conclusión, la micofumigación poscosecha con VOCs de *T. atroviride* IC-11 representa una alternativa prometedora para proteger arándanos del moho gris causado por *B. cinerea*.

You *et al.* (2022) desarrollaron el estudio titulado “Control biológico y promoción del crecimiento vegetal mediante compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma koningiopsis* T – 51”, con el objetivo de evaluar la actividad biocontroladora y promotora del crecimiento vegetal de los VOCs emitidos por *T. koningiopsis* T – 51. En este trabajo se demostró que los VOCs producidos por T-51 inhibieron significativamente el crecimiento micelial de *B. cinerea* (73,78 %) y *Fusarium oxysporum* (43,68 %). Asimismo, la germinación de conidios y la elongación del tubo germinativo de ambos hongos se vieron afectadas

negativamente por la exposición a los VOCs, reduciendo de forma notable la tasa final de germinación en *B. cinerea*. En ensayos con frutos de tomate, los VOCs redujeron la pudrición causada por *B. cinerea*, y en *Arabidopsis thaliana* se observó un aumento significativo del tamaño y peso de las plántulas. En total, se identificaron 24 compuestos volátiles pertenecientes a los grupos de alquenos, alcanos y ésteres. En conclusión, los resultados evidencian que *T. koningiopsis* T – 51 tiene un alto potencial como agente de control biológico indirecto, al integrar mecanismos que suprimen enfermedades y favorecen el desarrollo vegetal.

Joo & Hussein (2022) realizaron el estudio titulado “Propiedades de control biológico y promoción del crecimiento vegetal de *Trichoderma* spp., un antagonista productor de compuestos orgánicos volátiles”, con el objetivo de evaluar el efecto de los VOCs producidos por distintas cepas de *Trichoderma* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de fitopatógenos. Los VOCs mostraron una inhibición significativa del crecimiento de varios hongos fitopatógenos, incluyendo *B. cinerea*, *Alternaria panax*, *Cylindrocarpon destructans* y *Sclerotinia nivalis*, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Además, la exposición a VOCs de *Trichoderma* promovió el crecimiento de plántulas en germinación. Con el análisis GC – MS, se identificaron compuestos como ciclopentasiloxano decametilo y ciclotetrasiloxano octametilo en la cepa *T. harzianum* KNU1. En conclusión, estos hallazgos evidencian el potencial de los VOCs emitidos por

Trichoderma como recurso eficaz de biocontrol y como estimulantes del desarrollo vegetal.

Stracquadiano *et al.* (2020) realizaron el estudio titulado “Actividad antifúngica de metabolitos bioactivos producidos por *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma atroviride* en medio líquido”, con el objetivo de investigar la producción de metabolitos bioactivos con actividad antimicrobiana por parte de las cepas *T. atroviride* (TS) y *T. asperellum* (IMI 393899). Se evaluó la bioactividad de filtrados de cultivos de 10 y 30 días, extraídos con acetato de etilo, contra un conjunto de hongos patógenos y oomicetos. Los extractos de 30 días mostraron efectos citotóxicos significativos, con concentraciones mínimas fungicidas (MFC) entre 0,19 y 6,25 mg/mL. En los ensayos de cultivo dual, se registraron valores máximos de inhibición del crecimiento radial (PIRG) de 76 % para *T. asperellum* y 81 % para *T. atroviride* en condiciones de contacto directo, mientras que en contacto indirecto no se observó inhibición, indicando que los efectos no se debieron a compuestos volátiles. Mediante análisis por GC – MS y HPLC – Q – TOF – MS, se identificaron siete clases de VOCs y doce nVOCs. En conclusión, estos resultados muestran que ambas cepas presentan actividades antimicrobianas y representan fuentes naturales prometedoras de compuestos con actividad biológica.

Li *et al.* (2019) llevaron a cabo una revisión titulada “Metabolitos no volátiles de *Trichoderma* spp.”, cuyo objetivo fue recopilar y analizar aproximadamente 390 metabolitos secundarios no volátiles producidos por 20

especies conocidas y otras especies no identificadas del género *Trichoderma*. Esta revisión se centra en la clasificación de dichos compuestos según la especie de origen, su estructura química y sus actividades biológicas. *Trichoderma* es ampliamente reconocido por su capacidad de producir metabolitos bioactivos con aplicaciones en el control biológico, incluyendo poliquétidos, alcaloides, terpenoides y peptaibols. En conclusión, debido a estas propiedades, diversas especies han sido investigadas intensamente en el contexto del biocontrol de fitopatógenos fúngicos y como fuente de productos naturales con potencial farmacológico y agrícola.

Nawrocka *et al.* (2022) realizaron un estudio titulado “Determinación de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno y nuevos compuestos orgánicos volátiles en las respuestas de defensa de plantas de tomate contra *Botrytis cinerea* inducidas por *Trichoderma virens* TRS 106”, cuyo objetivo fue evaluar cómo *T. virens* TRS 106 reduce la enfermedad del moho gris causada por *B. cinerea* en plantas de tomate mediante la mejora de sus respuestas defensivas. Los resultados mostraron que las plantas de la variedad “Remiz” generaron más superóxido (O_2^-) y peroxinitrito ($ONOO^-$), pero menos peróxido de hidrógeno (H_2O_2), S – nitrosotioles (SNO) y compuestos volátiles de hoja verde (GLV) en comparación con la variedad “Perkoz”. Además, la infección con *B. cinerea* causó acumulación de óxido nítrico (NO) en cloroplastos, que no se detectó en plantas tratadas con TRS 106, mientras que el tratamiento con TRS 106 indujo la propagación sistémica de H_2O_2 y

acumulación de NO en apoplasto y núcleos. Se identificaron 24 VOCs liberados por las plantas tratadas, incluidos derivados de hexanol y ácido salicílico considerados por primera vez en la protección contra *B. cinerea*. En conclusión, *T. virens* TRS 106 modula la producción y localización de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y la emisión de nuevos compuestos volátiles, contribuyendo a la defensa de las plantas de tomate contra *B. cinerea*, lo que abre nuevas vías para investigar el papel de NO y VOCs en la protección inducida por *Trichoderma*.

2.2. Fundamento teórico

2.2.1. Control biológico

2.2.1.1. Definición y principios

El control biológico consiste en utilizar organismos naturales para gestionar plagas y enfermedades, brindando una opción sostenible frente al uso de pesticidas químicos. Este enfoque abarca varias estrategias, como el manejo de plagas, protección mediante barreras de exclusión y el refuerzo de los mecanismos de defensa natural de las plantas. Los principios fundamentales incluyen la comprensión del agroecosistema, la rotación del cultivo, la preservación de la salud del suelo y promoción de organismos beneficiosos (Cook, 1988; Ferron & Deguine, 2005). Para lograr un control efectivo, generalmente implica combinar diversos métodos y agentes de control, ya que ningún agente solo garantiza resultados óptimos (Thompson, 1930). Las aplicaciones pueden llevarse a cabo con la conservación de organismos nativos, la introducción de nuevos agentes o

aplicaciones repetidas (Cook, 1988). Además, los avances más recientes incorporan el uso de metabolitos microbianos bioactivos para la protección de cultivos (Chalfoun, 2010). Por ello, es esencial comprender de manera detallada la dinámica entre plagas, depredadores y el manejo del hábitat, tanto en áreas cultivadas y no cultivadas (Ferron & Deguine, 2005).

2.2.1.2. Clasificación de agentes biocontroladores

El control biológico es una estrategia sostenible para el manejo de plagas y enfermedades en la agricultura, utilizando organismos vivos con acción antagónica frente a fitopatógenos. Entre estos agentes se encuentran hongos, bacterias y actinomicetos, capaces de proteger a los cultivos al reemplazar o complementar el uso de plaguicidas sintéticos (Thambugala *et al.*, 2020; Torres-Rodriguez *et al.*, 2022).

Los hongos del género *Trichoderma* destacan por su capacidad antagónica frente a fitopatógenos, mediante mecanismos como el micoparasitismo, la competencia por recursos y la producción de metabolitos antifúngicos. De la misma manera, los actinomicetos, bacterias filamentosas como el género *Streptomyces*, han emergido como una fuente prometedora de compuestos antimicrobianos, alguno de los cuales ya han sido comercializados como biopesticidas (Bonaterra *et al.*, 2022), mostrando eficacia frente a diversos hongos fitopatógenos (Thambugala *et al.*, 2020; Torres-Rodríguez *et al.*, 2022). Además de su acción antagónica, estos microorganismos actúan como promotores del crecimiento vegetal, al participar en

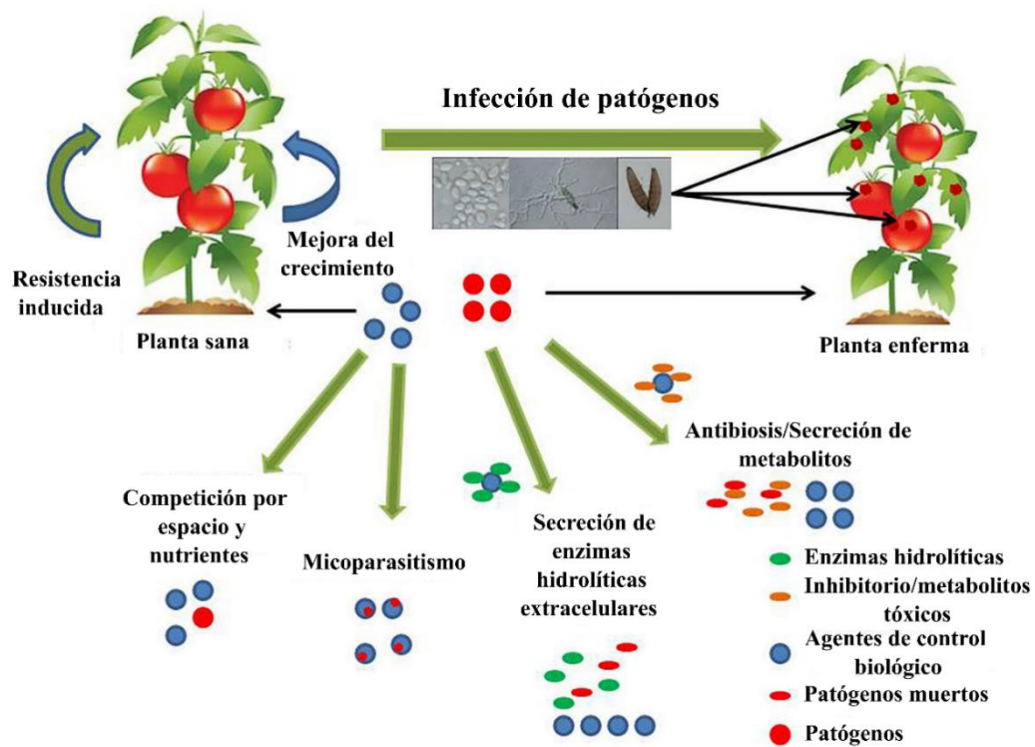
procesos como la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de fitohormonas, mejorando la nutrición y resistencia de los cultivos (Silva *et al.*, 2022).

2.2.1.3.Mecanismos de acción de agentes biocontroladores

Los agentes de biocontrol emplean estrategias de mecanismos directos como la antibiosis, producción de enzimas hidrolíticas que descomponen la pared celular y la liberación de compuestos orgánicos volátiles (Figura 1). Mientras que, los mecanismos indirectos comprenden la competencia por espacio y nutrientes, así como la inducción de resistencia sistémica en plantas hospedadoras (Haidar *et al.*, 2016; Roca-Couso *et al.*, 2021; Srivastava *et al.*, 2021). Diversos antagonistas, incluidas bacterias y levaduras como *Pseudozyma aphidis*, secretan metabolitos bioactivos capaces de inhibir el crecimiento de fitopatógenos y favorecer la salud vegetal (Srivastava *et al.*, 2021). La filósfera, interfaz aérea de las plantas, forma un nicho ecológico clave para el biocontrol, al albergar microorganismos que han desarrollado adaptaciones particulares a este ambiente. La comprensión de estos mecanismos es fundamental para crear alternativas sostenibles que sustituyan a los pesticidas químicos, favoreciendo una agricultura más segura y ambientalmente responsable (Legein *et al.*, 2020; Roca-Couso *et al.*, 2021).

Figura 1

Mecanismos clave del control biológico de enfermedades fúngicas en plantas por hongos antagonistas



Nota. Adaptado de *Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens*, por K. M. Thambugala, D. A. Daranagama, A. J. L. Phillips, S. D. Kannangara y I. Promputtha, 2020, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, Artículo 604923. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>.

2.2.2. *Características y mecanismos antifúngicos de Trichoderma spp.*

2.2.2.1. **Taxonomía y diversidad**

La taxonomía del género *Trichoderma* ha evolucionado significativamente a lo largo del tiempo, pasando de métodos morfológicos tradicionales a enfoques moleculares de alta resolución. Actualmente, se reconocen 375 especies válidas, de las cuales 361 cuentan con códigos de barras moleculares en regiones como ITS, *tef1* y *rpb2* (Cai & Druzhinina, 2021). Esta transición ha representado una expansión notable clave para la identificación de especies crípticas y delimitación de grupos filogenéticos dentro del género.

Históricamente, la clasificación del género puede dividirse en distintas etapas. Antes de 1969, el reconocimiento de especies era muy limitado y centrado principalmente en el complejo *Trichoderma viride*. Entre 1969 y 2000, se amplió los conceptos de especie con el establecimiento de secciones como *Longibrachiatum*, *Trichoderma* y *Pachybasium*, aunque seguía predominando los criterios morfológicos. Desde el año 2000, la incorporación del análisis multilocus permitió un rápido aumento en el número de especies reconocidas, destacándose estudios sobre el agregado *Trichoderma koningii* y el clado *Longibrachiatum* (Samuels *et al.*, 2006). Entre 2015 y 2021, el uso masivo de marcadores molecular principales remarcó esta tendencia, manifestándose en un incremento exponencial en la identificación de especies (Cai & Druzhinina, 2021).

Entre los marcadores más empleados destacan *tefl* (más utilizado), seguido por ITS y *rpb2*, mientras que otros como *act1*, 18S rDNA, 28S rDNA, mitSSU, *ech42*, actina, calmodulina y *EF-1a* han sido útiles en estudios específicos (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002; Samuels *et al.*, 2006; Jaklitsch & Voglmayr, 2015). Este enfoque ha permitido el establecimiento de clados filogenéticos bien definidos, como los grupos *Harzianum* – *Virens*, así como la diferenciación de linajes principales dentro del agregado *T. koningii*, que ha sido desagregado en al menos 12 especies distintas y una variedad.

La diversidad del género presenta una distribución tanto cosmopolita como localizada. Estudios como los de Jaklitsch & Voglmayr (2015) han identificado aproximadamente 90 especies en Europa del sur y Macaronesia, mientras que Samuels (2006) documenta 89 especies a nivel global, incluyendo tanto formas sexuales (teleomorfos) como asexuales (anamorfos), destacando además que *Trichoderma* e *Hypocrea* son géneros congéneres.

El desarrollo de herramientas bioinformáticas y bases de datos especializadas ha representado un paso esencial hacia la estandarización en la identificación taxonómica y la incorporación continua de nuevas especies (Cai & Druzhinina, 2021). Por ello, estos avances en conjunto han permitido no solo mejorar la resolución taxonómica, sino también comprender la complejidad filogenética del género con mayor rigurosidad y profundidad.

2.2.2.2.Ecología

El género *Trichoderma* se destaca por su versatilidad ecológica, especialmente en ambientes edáficos. Estas especies habitan predominantemente la rizósfera, donde desempeñan funciones clave en la dinámica microbiana del suelo y en las interacciones planta-microorganismo. Más allá de una simple coexistencia, *Trichoderma* actúa como agente de biocontrol frente a fitopatógenos mediante diversos mecanismos, entre los que se incluyen la antibiosis, la competencia por espacio y nutrientes, y el micoparasitismo (Sood *et al.*, 2020).

Además, estas especies son capaces de sintetizar una amplia gama de metabolitos secundarios que median interacciones relacionadas con microorganismos del suelo como con plantas. Tales compuestos no solo tienen efectos directos sobre los patógenos, sino que también pueden modular la composición estructural de las comunidades microbianas rizosféricas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016).

Desde una perspectiva funcional, *Trichoderma* contribuye de manera activa a la promoción del crecimiento vegetal, facilitando la absorción de nutrientes, modular el desarrollo radicular colonizando las raíces y activar respuestas de resistencia sistémica frente a estreses bióticos y abióticos (Woo *et al.*, 2023).

No obstante, es importante considerar que, si bien *Trichoderma* tiene efectos beneficiosos ampliamente documentados, la producción de ciertos metabolitos también puede impactar negativamente sobre microorganismos no patógenos

considerados beneficiosos, alterando el equilibrio de la microbiota nativa (Shahriar *et al.*, 2022).

2.2.2.3.Mecanismos de biocontrol

- **Producción de metabolitos antifúngicos**

Las especies del género *Trichoderma* han sido ampliamente reconocidas por su potencial como agentes de biocontrol frente a hongos fitopatógenos, debido a su capacidad para producir metabolitos volátiles y no volátiles con actividad antifúngica (Ahluwalia *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019; Stracquadanio *et al.*, 2020; Hernández *et al.*, 2024). Cepas como *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma atroviride* destacan por la secreción de compuestos bioactivos, entre ellos fenoles, antraquinonas, pironas y lactonas, que han demostrado eficacia en ensayos de cultivo dual y pruebas de concentración mínima fungicida. (Ahluwalia *et al.*, 2015; Stracquadanio *et al.*, 2020; Hernández *et al.*, 2024).

Para la identificación y caracterización de estos metabolitos secundarios se han empleado técnicas analíticas avanzadas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), la cromatografía líquida de alta resolución con tiempo de vuelo en tándem (HPLC-Q-TOF-MS) y la ultra alta resolución con ionización por electrospray y espectrometría de masas en tándem (UHPLC-ESI-HRMS/MS) (Stracquadanio *et al.*, 2020; Hernández *et al.*, 2024).

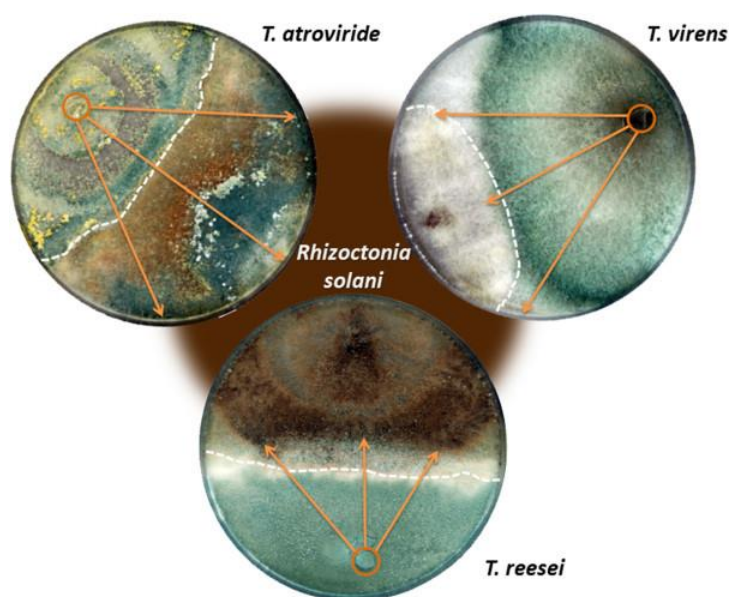
- **Micoparasitismo:**

El micoparasitismo representa uno de los mecanismos más importantes mediante los cuales *Trichoderma* ejerce su acción antagonista. Este proceso involucra la producción de enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios y pequeñas proteínas secretadas que contribuyen a la degradación e inhibición del hongo hospedero (Figura 2) (Atanasova *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2022). Mediante microscopía electrónica de barrido, se ha observado la formación de estructuras especializadas como espirales hifales, ganchos y apresorios, responsables de la adhesión, lisis y posterior penetración del micelio del patógeno (Elad *et al.*, 1983).

Este mecanismo ha demostrado ser efectivo contra diversos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Sin embargo, también se ha registrado micoparasitismo entre especies del mismo género, como en el caso de *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma pseudokoningii*. Este tipo de interacción intragénero podría comprometer la eficacia de *Trichoderma* en campo al generar competencia intragénero y comprometer su estabilidad ecológica (Vajna, 1985).

Figura 2

Crecimiento de Trichoderma spp. sobre Rhizoctonia solani en ensayos de confrontación dual tras 10 días de incubación.



Nota. Las flechas indican la sobreposición de *Trichoderma* spp. sobre *R. solani*.

Adaptado de *Comparative transcriptomics reveals different strategies of Trichoderma mycoparasitism*, por L. Atanasova, S. Le Crom, S. Gruber, F. Couplier, V. Seidl-Seiboth, C. P. Kubicek y I. S. Druzhinina, 2013, *BMC Genomics*, 14, 121. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-121>

- **Estimulación de la planta:**

Trichoderma spp. también son caracterizados por favorecer el crecimiento vegetal y mejorar la tolerancia frente a condiciones adversas. Produce metabolitos señalizadores como el ácido indolacético y compuestos orgánicos volátiles que

inducen el crecimiento incluso sin contacto directo con la planta (Contreras-Cornejo *et al.*, 2024).

Durante la colonización de raíces, modula las respuestas inmunes de la planta hospedera, induciendo una reprogramación génica que facilite una interacción benéfica sostenida (Brotman *et al.*, 2013). Además, promueve la activación de genes relacionados con la defensa frente a estrés biótico y abióticos, como salinidad o déficit hídrico (Pacheco-Trejo *et al.*, 2022).

En cultivos como el maíz, la aplicación de *Trichoderma* incrementa la biomasa radicular incluso en semillas tratadas previamente con fungicidas (Resende *et al.*, 2004). Asimismo, en condiciones salinas, favorece la germinación de semillas y estimula respuestas antioxidantes y de protección osmótica (Brotman *et al.*, 2013). Además, se ha propuesto que los efectos benéficos pueden perdurar a través de generaciones, lo que representa un aporte clave para la sostenibilidad agrícola (Contreras-Cornejo *et al.*, 2024).

2.2.3. *Biología y patogenicidad de Botrytis cinerea*

2.2.3.1. Características taxonómicas

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno clasificado en el reino Fungi, filo Ascomycota, clase Leotiomycetes, orden Helotiales y familia Sclerotiniaceae (Williamson *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2024). De estilo de vida necrótrofo, posee una alta capacidad de adaptación y diversidad genética que le permite infectar más

de 1600 especies vegetales y causar importantes pérdidas a nivel global (Singh *et al.*, 2024).

Su patogenicidad se basa en la producción de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular vegetal, toxinas específicas y pequeñas moléculas de ARN que interfieren con la defensa del huésped (Williamson *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2024). Presenta un ciclo de vida dimórfico, con una fase asexual (*B. cinerea*) y una fase sexual (*Botryotinia fuckeliana*) (da Silva Ripardo-Filho *et al.*, 2023).

Se ha reportado su presencia en nuevas especies vegetales nativas de Chile, ampliando su rango de hospedantes. La mayoría de los aislados analizados contienen los elementos transponibles *boty* y *flipper*, que podrían contribuir a su variabilidad genética (Notte *et al.*, 2021). Dada la dificultad de su control, se han propuesto estrategias integradas de manejo fitosanitario, así como el uso emergente de herramientas basadas en ARN pequeños para interferir en la expresión génica del hongo (Singh *et al.*, 2023).

2.2.3.2.Ciclo de vida

El ciclo de vida depende estrechamente de condiciones ambientales como temperatura, humedad y pH (Latorre *et al.*, 2002; Calvo-Garrido *et al.*, 2014). El proceso inicia con la germinación de conidios, que ocurre en un rango de temperatura entre 5 °C y 30 °C, con un óptimo de 20 °C, favorecido en presencia de agua libre o una humedad relativa superior al 93 % (Latorre *et al.*, 2002).

Posteriormente, se produce la elongación del tubo germinativo entre las 48 y 72 horas, y penetra en las células epidérmicas del hospedero hacia las 96 horas, sin necesidad de apresorios (Rivas Santoyo *et al.*, 2007). Posteriormente, el micelio se desarrolla bajo la cutícula vegetal, generando lesiones y maceración de los tejidos (van Kan, 2005). La esporulación puede iniciarse entre los 3 y 4 días después, influenciada por ácidos como el málico y tartárico, así como el pH del entorno (Doneche & Pucheu-Plante, 2015).

Además de la infección activa, *Botrytis cinerea* emplea estrategias de persistencia como la formación de microesclerocios (Moyano Cárdbaba, 2001), que le permitan sobrevivir en condiciones desfavorables. Las infecciones primarias suelen originarse en tejidos necróticos o durante la floración (Ciliberti *et al.*, 2015), mientras que las secundarias se propagan por estructuras de resistencia dispersados por el viento o transportados por vectores como *Drosophila melanogaster* (Louis *et al.*, 1996).

Se ha observado también que el micelio sobrevive en campo como en invernaderos durante el verano, actuando como fuente de inóculo para nuevas infecciones. En la planta hospedera, se han identificado respuestas fisiológicas como la acumulación de gránulos rojos en las células vecinas al sitio de infección y la producción de etileno que pueda favorecer la germinación fúngica (Rivas Santoyo *et al.*, 2007).

Estos factores explican su éxito como patógeno en cultivos agrícolas y la dificultad de su control efectivo en el campo (van Kan, 2005; Calvo-Garrido *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2024).

2.2.3.3. Daños en *Vitis vinifera*

Botrytis cinerea, causante de la podredumbre gris y la momificación en *Vitis vinifera*, es uno de los patógenos más perjudiciales para los viñedos a nivel mundial, comprometiendo el rendimiento y calidad de las uvas. La infección provoca una reprogramación del transcriptoma y metaboloma de la vid, activando mecanismos de defensa mediados por ácido jasmónico, etileno y metabolitos secundarios como el transresveratrol (Figura 3) (Agudelo-Romero *et al.*, 2015). Aunque la mayoría de las variedades de *V. vinifera* son altamente susceptibles, algunos cultivos e híbridos presentan resistencia parcial (Naegele, 2018). En viñedos chilenos también se ha reportado la presencia de *Botrytis prunorum*, afectando flores y bayas, aunque menos agresivo que *B. cinerea* (Esterio *et al.*, 2020).

Los síntomas aparecen en las hojas, flores y frutos de la planta. En hojas, aparecen manchas necróticas que pueden provocar defoliación, y en condiciones favorables, se observa micelio blanco y algodonoso (Hill, 2014; Dwivedi *et al.*, 2024). En las flores, la infección puede interferir con la polinización y mantenerse latente hasta el desarrollo del fruto (Hill, 2014).

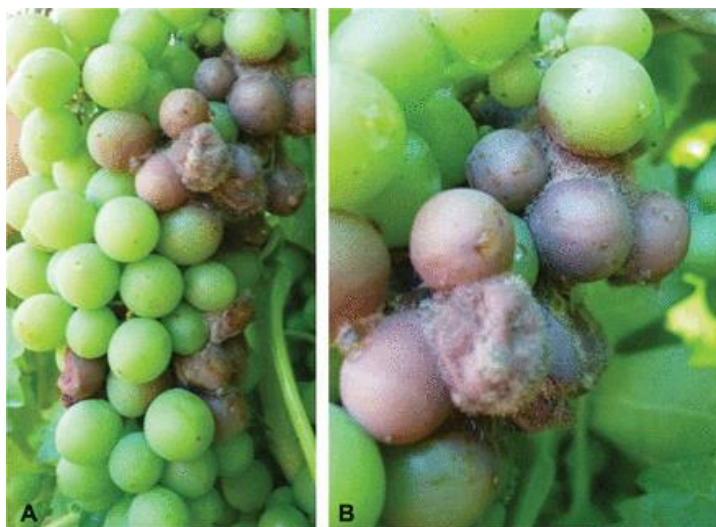
Las mayores pérdidas económicas ocurren en la poscosecha, cuando la infección reduce la calidad y vida útil de la fruta, haciéndolas no aptas para el

mercado por su rápida descomposición y apariencia poco atractiva (Droby & Lichter, 2006; Latorre *et al.*, 2015; De Simone *et al.*, 2020; Dwivedi *et al.*, 2024; Xing *et al.*, 2024).

El uso de fungicidas, como el dióxido de azufre, ha demostrado ser eficaz, en parte por su efecto sobre los mecanismos antioxidantes de la planta (De Simone *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2024). También, se ha logrado avances en el control biológico mediante el uso de *Trichoderma* spp. y *Aureobasidium pullulans*, que han reducido la incidencia del hongo poscosecha (Zhang *et al.*, 2020; Herrera-Défaz *et al.*, 2023). El manejo integrado de plagas (MIP), que combina métodos culturales, físicos y químicos, ha mostrado alta efectividad. Un ejemplo exitoso de esto es el enfoque adoptado en China, conocido como “controlar mejor y reducir la fumigación”, que enfoca la intervención en etapas críticas de la infección (Wang *et al.*, 2023). Sin embargo, el desarrollo de cepas resistentes a fungicidas subraya la necesidad de desarrollar variedades más resistentes y en medidas de control alternativas (Naegele, 2018; Esterio *et al.*, 2020).

Figura 3

Racimo de uvas de la variedad Trincadeira en la etapa EL33 afectado por Botrytis cinerea.



Nota. A. En este estadio, algunas bayas del racimo ya mostraban signos de esporulación del hongo. B. Detalle ampliado de la imagen A. Adaptado de *Transcriptome and metabolome reprogramming in Vitis vinifera cv. Trincadeira berries upon infection with Botrytis cinerea*, por P. Agudelo-Romero, A. Erban, C. Rego, P. Carbonell-Bejerano, T. Nascimento, L. Sousa, J. M. Martínez-Zapater, J. Kopka y A. M. Fortes, 2015, *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1769–1785. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru517>

2.2.4. Metabolitos extracelulares de *Trichoderma* spp.

Las especies del género *Trichoderma* se destacan por su producción de metabolitos secundarios implicados en una gamma de funciones biológicas relacionados a contextos agrícolas y biotecnológicos. Estos metabolitos pueden clasificarse en dos grandes grupos según su volatilidad: volátiles y no volátiles, ambos con efecto antimicrobiano, de promoción del crecimiento vegetal y rol en la comunicación entre organismos, la competencia por recursos y defensa contra fitopatógenos (Cubilla-Ríos *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2020; Gualtieri *et al.*, 2022).

2.2.4.1. Metabolitos volátiles (MVs)

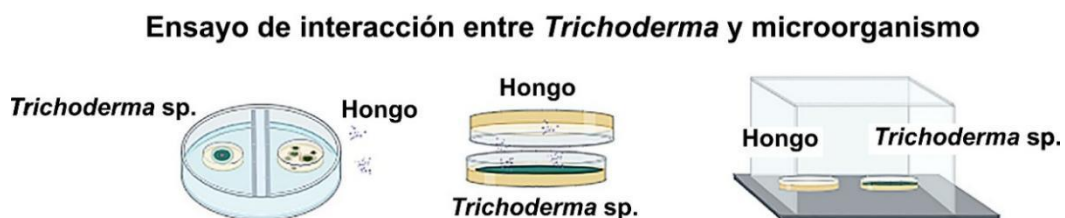
Los MVs de *Trichoderma* pueden ser evaluados por diferentes métodos (Figura 4), y abarcan principalmente alcoholes, cetonas, pironas, sesquiterpenos, ésteres, furanos y compuestos aromáticos, con funciones desde la señalización hasta la inhibición directa de fitopatógenos. En los estudios revisados, se identificaron varias clases de compuestos volátiles que son producidos por diferentes especies de *Trichoderma* en cultivos *in vitro*. Entre los alcoholes y cetonas se encuentra el 1-octen-3-ol, 3-octanol y la 3-octanona, ambos asociados con la señalización de la conidiación y actividad antimicrobiana (Martínez-Padrón *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2019). Las pironas como 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PAP), son conocidas por su capacidad de inhibir el crecimiento fúngico y promover el crecimiento vegetal (Jeleń *et al.*, 2014). Estos compuestos han demostrado un efecto en el crecimiento y morfología de diversos hongos fitopatógenos, como *Pyrenophora teres*, *Fusarium*

sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* además de inducir respuestas de defensa en plantas y su crecimiento (Moya *et al.*, 2018).

En cuanto a las condiciones de cultivo, factores como la temperatura, tipo de medio y la presencia de fitopatógenos, influyen significativamente en la producción de estos metabolitos. Moya *et al.* (2018) reportaron, por ejemplo, que la presencia de *Fusarium* sp. induce una mayor producción de compuestos volátiles en *Trichoderma*.

Figura 4

Representación gráfica del sistema empleado para evaluación del impacto de los metabolitos volátiles



Nota. Sistemas de placas divididas, placas invertidas y cultivo dual para investigar el impacto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma* con hongos. Adaptado de *Microbial antagonists as biocontrol agents against postharvest fungal diseases in fruits: Mechanisms and applications*, por M. Dwivedi, M. C. Meena, y M. B. Reddy, 2024, *Scientia Horticulturae*, 323, Artículo 112984. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112984>

2.2.4.2. Metabolitos no volátiles (MNVs)

Los MNVs de *Trichoderma* se agrupan químicamente en ocho clases principales: alcoholes, ésteres, lactonas, terpenos, antraquinonas, ácidos grasos, furanonas y proteínas (Cubilla-Ríos *et al.*, 2019; Sridharan *et al.*, 2021), que se caracterizan por poseer propiedades fisicoquímicas distintas que influyen tanto en su modo de acción como en su estabilidad y biodisponibilidad.

Los extractos etanólicos obtenidos a partir de cultivos líquidos de *Trichoderma* han mostrado actividad inhibitoria contra una variedad de fitopatógenos (Isaias *et al.*, 2014). Por ejemplo, se reportó que *Trichoderma arundinaceum* inhibe el crecimiento de *Macrophomina phaseolina* en condiciones *in vitro*, mientras que *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* afectan a patógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae* (Cubilla-Ríos *et al.*, 2019; Dubey *et al.*, 2011).

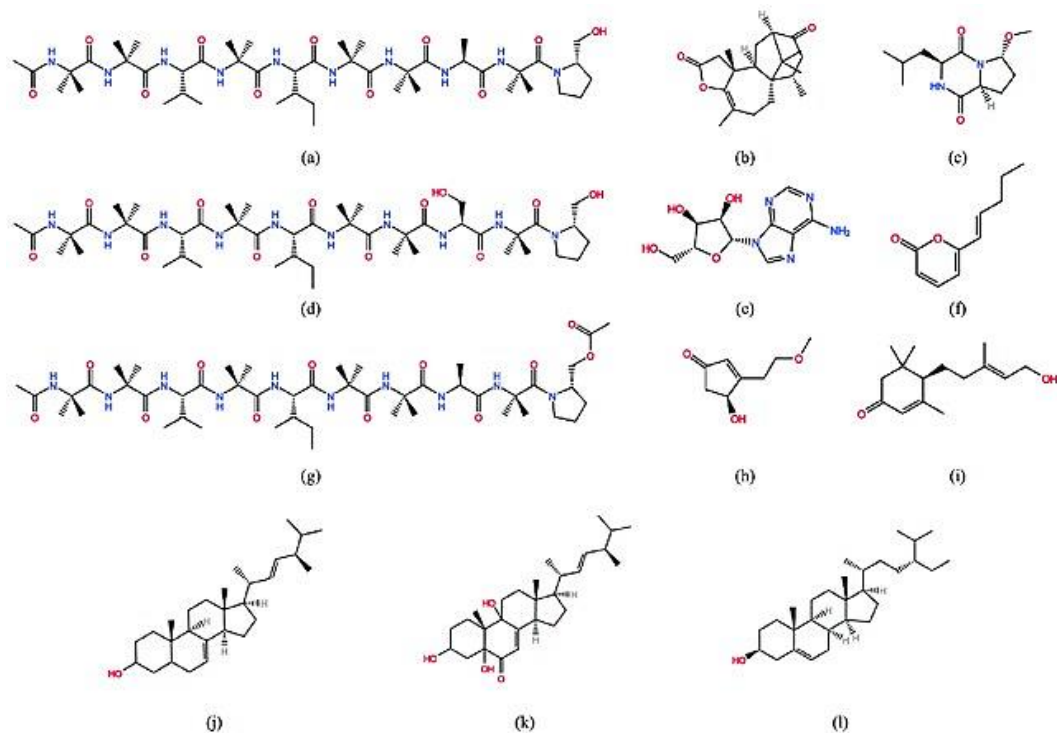
Entre los metabolitos no volátiles identificados se encuentran 2-feniletanol, β -sitosterol, 6-PP, 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona, tirosol, harzianum A, konigin-A, ácido palmítico, etc (Sridharan *et al.*, 2021). Estos compuestos actúan mediante la disrupción de membranas, inhibición de enzimas y la alteración de la morfología celular, llegando a provocar vacuolización y lisis celular en los hongos tratados (Stefanova *et al.*, 1999). Algunas estructuras se aprecian en la figura 5.

La producción de estos MNVs depende de las condiciones de cultivo, como el tipo de medio líquido o sólido, temperatura y tiempo de incubación. Por ello, la

composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento pueden modular significativamente el perfil metabólico de las especies de *Trichoderma* (Dubey *et al.*, 2011).

Figura 5

Estructura química de metabolitos no volátiles de *Trichoderma asperellum* IMI 393899 y *Trichoderma atroviride* TS



Nota. (a) Asperelina A; (b) *Trichodermaerina*; (c) Metilcordisina A; (d) Asperelina E; (e) Nucleósido de adenina; (f) 6-pent-1-enilpirano-2-ona; (g) Asperelina H; (h) *Atrichodermona* B; (i) *Atrichodermona* C; (j) Ergosta-7,22-dien-3-ol; (k) 3,5,9-trihidroxi ergosta-7,22-dien-6-ona; y (l) Beta-sitosterol. Adaptado de *Antifungal*

Activity of Bioactive Metabolites Produced by Trichoderma asperellum and Trichoderma atroviride in Liquid Medium, por C. Stracquadano, J. M. Quiles, G. Meca y S. O. Cacciola, 2020, *Journal of Fungi*, 6(4), Artículo 263. <https://doi.org/10.3390/jof6040263>

2.2.4.3. Métodos de extracción y purificación

Las especies de *Trichoderma* son reconocidas por la producción de diversos metabolitos secundarios con aplicaciones potenciales tanto en la agricultura como en la industria. Estos metabolitos incluyen compuestos con propiedades bioactivas, como peptaibióticos, que presentan actividades antifúngicas y promotoras del crecimiento vegetal (Ortuño *et al.*, 2013; Martínez-Padrón *et al.*, 2018).

La producción de metabolitos suele realizarse bajo fermentación en medios líquidos, como el caldo papa dextrosa (PDB), que favorece su acumulación (Ortuño *et al.*, 2013; Martínez-Padrón *et al.*, 2018). Para la extracción de los metabolitos, se emplea filtración del cultivo para separar micelio, seguida de una extracción en fase líquido-líquido con disolvente como el cloruro de metileno. Posteriormente, se pueden utilizar métodos cromatográficos, como GC-MS, que permite identificar y caracterizar los metabolitos producidos por *Trichoderma* (Martínez-Padrón *et al.*, 2018; Setargie *et al.*, 2023). Además, la purificación de proteínas en los extractos se puede optimizar por liofilización y precipitación con ácido tricloroacético en acetona (Cubilla-Ríos *et al.*, 2020).

Los peptaibióticos, han mostrado eficacia antifúngica contra patógenos como *Fusarium oxysporum* y efectos positivos en el desarrollo de plantas de tomate y rábano (Ortuño *et al.*, 2013; Martínez-Padrón *et al.*, 2018; Setargie *et al.*, 2023). La combinación de técnicas cromatográficas y espectroscópicas proporciona una caracterización completa de los metabolitos, lo que facilita la comprensión de sus propiedades y potenciales aplicaciones (Setargie *et al.*, 2023).

2.2.5. Evaluación de la eficacia antifúngica

2.2.5.1. Ensayos *in vitro*

- **Antibiosis**

La técnica de cultivo dual es ampliamente utilizada para evaluar la actividad antibiótica de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Consiste en inocular tanto a *Trichoderma* como al patógeno en placas de agar, ya sea simultáneamente o con una preincubación, midiendo el halo de inhibición según el crecimiento radial del patógeno respecto al control (Weindling, 1932)

Distintas especies de *Trichoderma* han mostrado efectos inhibitorios significativos. *Trichoderma viride* logró inhibir un 76,94 % del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Ayele *et al.*, 2021), mientras que *Trichoderma koningii* mostró efectividad frente a *F. oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani* (Shaikh & Sahera, 2012). Asimismo, *Trichoderma lignorum*, a una concentración de 10^5 esporas/mL y con 24 h de preincubación, inhibió completamente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sarro Baro

et al., 2010). En base a ello, factores como la concentración de inóculo, tiempo de incubación y condiciones ambientales, influyen en la eficacia del antagonismo, al afectar la producción de metabolitos antibióticos (Perek & Świerczyńska, 2012; Álvarez-García *et al.*, 2020).

Estas pruebas son fundamentales para identificar cepas prometedoras. Por ejemplo, *T. harzianum* presentó tasas de inhibición que variaron entre el 40 % y el 82 % frente a *F. oxysporum*, dependiendo de la cepa y las condiciones experimentales (Reyes Ramírez *et al.*, 2012).

- **Micoparasitismo**

El micoparasitismo es determinado por el método de placa pre colonizada, y es uno de los principales mecanismos de biocontrol ejercidos por *Trichoderma*, basado en una interacción directa con hongos fitopatógenos (Benhamou & Chet, 1993; Prasad & Kumar, 2013). Este proceso se inicia con el entrelazamiento de hifas, donde las de *Trichoderma* rodean a las del patógeno, como se ha observado con *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora palmivora* (Sarria *et al.*, 2021).

Durante el contacto, especies como *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma harzianum* desarrollan estructuras similares a apresorios o ganchos, que facilitan la adherencia y penetración en el huésped (Chet *et al.*, 1981; Inbar *et al.*, 1996). Una vez establecida la interacción, *Trichoderma* invade las hifas del patógeno, generando daños como vacuolización, colapso celular y retracción citoplasmática (Chet *et al.*, 1981; Gao *et al.*, 2002; Prasad & Kumar, 2012).

Este tipo de antagonismo está mediado por señales químicas emitidas por los patógenos, que inducen quimiotropismo en *Trichoderma*, orientando su crecimiento hacia el huésped (Elad *et al.*, 1987). Una vez en contacto, produce enzimas hidrolíticas como quitinasas, β -1,3-glucanasas y proteasas, que degradan la pared celular del hongo objetivo (Benhamou & Chet, 1996; Inbar *et al.*, 1996).

Factores ambientales como temperatura, actividad de agua, pH y disponibilidad de nutrientes influyen significativamente en la eficacia del micoparasitismo. Por ejemplo, *T. harzianum* actúa con mayor eficacia contra *A. alternata* entre 20 – 25 °C y con actividad de agua superior a 0,90 (Sempere & Santamarina, 2007). Así mismo, condiciones ácidas o neutras y disponibilidad de nutrientes potencia la producción de enzimas líticas (Benhamou & Chet, 1996; Inbar *et al.*, 1996).

- **Germinación de conidios**

Diversas especies de *Trichoderma* han demostrado, en condiciones de laboratorio, una gran capacidad para inhibir la germinación de conidios en fitopatógenos como *Colletotrichum capsici*, *Fusarium* spp. y *Sclerotium rolfsii*. La eficacia del antagonismo se evalúa con cámara de recuento Neubauer, que permiten cuantificar con precisión los conidios germinados y no germinados. En experimentos *in vitro*, *Trichoderma* spp. logró inhibir la germinación en un 68,2 % frente a *C. capsici*, 53,9 % contra *Fusarium* spp. y 35,5 % frente a *S. rolfsii* (Alfizar *et al.*, 2013). También, filtrados de cultivo de *Trichoderma harzianum* y

Trichoderma pseudokoningii inhibieron por completo la germinación de conidios de patógenos poscosecha, incluso a diluciones del 50 % (Odebode, 2006). Estos resultados destacan el potencial de *Trichoderma* como agente de biocontrol.

2.2.5.2. Ensayos *in vivo*

- **Modelos en frutos**

El uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol en viticultura ha demostrado eficacia frente a *Botrytis cinerea* en uvas, especialmente en ensayos con heridas artificiales que simulan condiciones naturales de infección. Especies como *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma gamsii* han reducido significativamente la incidencia y severidad de la enfermedad, aunque la efectividad depende de la cepa y condiciones ambientales (Di Marco *et al.*, 2022; Herrera-Défaz *et al.*, 2023). Por otro lado, se ha observado que algunas cepas pueden permanecer activas en los tejidos tratados por varios meses, brindando protección prolongada.

El momento de aplicación realizada poco después de generarse las heridas en el fruto permite a *Trichoderma* colonizar antes que el patógeno (Pollard-Flamand *et al.*, 2022; Langa-Lomba *et al.*, 2023).

Ensayos de campo a largo plazo han confirmado estas observaciones, reportando reducciones de hasta un 90 % en la incidencia de enfermedades fúngicas con aplicaciones sistemáticas en viñedos (Di Marco *et al.*, 2022). No obstante, la eficacia puede variar según la cepa, condiciones edafoclimáticas y compatibilidad

con otros insumos, por lo que se sugiere integrar su uso de manera cauta dentro del manejo sanitario del viñedo (Langa-Lomba *et al.*, 2023; Mkhwanazi *et al.*, 2024).

- **Cámaras de micofumigación**

Los MVs emitidos por *Trichoderma* representan una alternativa prometedora en el control poscosecha de frutas. Por ejemplo, el 6-pentil- α -pirona (6PP) de *Trichoderma atroviride* IC-11 ha inhibido eficazmente el crecimiento de *B. cinerea* en arándanos (Bello *et al.*, 2022), mientras que el alcohol feniletílico, emitido por *Trichoderma asperellum* T76-14, inhibió el crecimiento de *Fusarium incarnatum* en melones (Intana *et al.*, 2021). Además, se ha observado que cepas de *Trichoderma* estimulan la producción de COVs en plantas como el olivo, afectando positivamente las vías bioquímicas de protección para el huésped (Dini *et al.*, 2021). COVs vegetales como el *trans*-2-hexenal, carvacrol y citral también han mostrado actividad fungicida contra *Monilinia laxa* en frutos de hueso (Neri *et al.*, 2007). Estos hallazgos refuerzan el potencial de la micofumigación, basada en COVs fúngicos o vegetales, como estrategia sustentable frente a la pudrición poscosecha.

2.2.5.3. Parámetros de medición

La eficacia de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol frente a fitopatógenos se evalúa mediante distintos parámetros cuantitativos, entre los que destacan el crecimiento radial, el porcentaje de inhibición y el índice de control

biológico. Estos indicadores permiten caracterizar la actividad antagonista de cada cepa y seleccionar las más prometedoras para su uso en campo.

El crecimiento radial mide la expansión del micelio sobre medios sólidos a lo largo del tiempo, y se utiliza para comparar la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* frente a hongos patógenos como *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. (Reyes *et al.*, 2008; Andrés *et al.*, 2022).

El porcentaje de inhibición indica la reducción en el crecimiento del fitopatógeno debido a la presencia de *Trichoderma*, y se obtiene comparando el desarrollo del patógeno en presencia y ausencia del antagonista. Altos valores de inhibición evidencian un efecto significativo sobre el crecimiento del patógeno, como ha sido reportado para *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Martínez *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2011).

El índice de control biológico ofrece una visión integrada del potencial antagonista de una cepa, considerando parámetros como la inhibición del crecimiento, la producción de metabolitos antifúngicos y la manifestación de mecanismos de micoparasitismo (Mukhopadhyay & Kumar, 2020). Este índice resulta útil para la selección de cepas eficaces en condiciones reales de cultivo (Martínez *et al.*, 2008). Comprender estas interacciones es clave para asegurar su desempeño en contextos agrícolas variables, y para promover su integración en sistemas de manejo sostenible (Mukhopadhyay & Kumar, 2020; Andrés *et al.*, 2022).

2.2.6. *Identificación molecular de Trichoderma*

2.2.6.1. Loci genéticos

Para mejorar la resolución taxonómica dentro del género *Trichoderma*, se emplean diversos loci genéticos que permiten detectar variabilidad intra e interespecífica. Entre los más utilizados destacan la región ITS (espaciador transcrito interno), el gen *tef1* (factor de elongación 1-alfa) y el gen *rpb2* (subunidad 2 de la ARN polimerasa II), debido a la información complementaria que aportan sobre la diversidad genética y la estructura poblacional de las especies.

La región ITS del ADN ribosómico es ampliamente utilizado en taxonomía fúngica debido a su alta tasa de variación, que permite diferenciar especies estrechamente relacionadas. Estudios han reportado polimorfismos en esta región entre aislamientos de *Trichoderma*, facilitando la diferenciación de especies como *T. koningiopsis*, entre otras (Kim *et al.*, 2000; Menezes *et al.*, 2010). Sin embargo, otros locus como *tef1* y *rpb2* ofrecen ventajas complementarias. El locus *tef1* ha demostrado ser una herramienta eficaz para evaluar la diversidad genética y estructura poblacional del género, clave en la identificación de cepas procedentes de suelo y tejidos endófitos, lo que mejora su selección para ámbitos agrícolas (Ismail *et al.*, 2024). Por su parte, *rpb2*, al ser un gen de copia única y menos propenso a ambigüedades, representa una alternativa robusta a ITS para estudios filogenéticos, permitiéndonos una discriminación más precisa entre especies y cobertura taxonómica más amplia (Větrovský *et al.*, 2016).

2.2.6.2. Filogenia multilocus

El uso de análisis filogenéticos multilocus ha demostrado ser esencial para delimitar con precisión las especies del género *Trichoderma*. Métodos como la máxima verosimilitud (ML) y la inferencia Bayesiana permiten integrar datos de varios loci, como *acl1*, *act*, *rpb2* y *tefl*, lo que incrementa la resolución taxonómica y evita el sesgo de errores asociados a un único marcador

Bustamante *et al.* (2021) aplicaron esta estrategia combinada con cuatro métodos moleculares para identificar 108 especies en el linaje *Harzianum* y 39 en *Longibrachiatum*. Asimismo, Dangallo *et al.* (2025) reportaron la identificación de *Trichoderma protrudens* con un sólido soporte estadístico de 100 % de ML y probabilidad posterior bayesiana de 1,00. El enfoque más efectivo para la delimitación de especies es aquel que integra datos morfológicos y moleculares. Asis *et al.* (2021), por ejemplo, emplearon secuencias multilocus complementado con datos morfológicos para identificar 53 cepas de *Trichoderma*, confirmando su clasificación taxonómica y evidenciando su adaptabilidad ecológica. No obstante, aunque los análisis multilocus incrementan la precisión, depender en su totalidad de información genética puede llevar a subestimar la diversidad fenotípica relevante. Por ello, se recomienda aplicar un enfoque integrado que integre tanto datos moleculares como morfológicos, a fin de obtener resultados más robustos en estudios taxonómicos y ecológicos.

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño de estudio

El tipo de investigación es aplicada, porque se enfoca en resolver un problema concreto, la “podredumbre gris” en uva de mesa, mediante la evaluación práctica de los metabolitos de *Trichoderma* spp. directamente en bayas de uva infectadas para el control del patógeno.

El diseño es experimental, ya que se manipula la variable independiente (metabolitos volátiles y no volátiles de *Trichoderma* spp.) para evaluar su efecto causal sobre la variable dependiente (inhibición del crecimiento micelial, germinación de conidios y severidad de la infección por *Botrytis cinerea*). Se aplicó un diseño completamente aleatorizado (DCA), en el cual los tratamientos (cepas de *Trichoderma*, metabolitos a concentraciones de 30 %, 40 % y 50 %, y controles) fueron asignados al azar a las unidades experimentales (placas de agar y bayas de uva), con tres réplicas por tratamiento. Se incluyeron controles negativos (sin metabolitos) y positivos (tebuconazol). Este enfoque permite establecer relaciones causales entre los metabolitos de *Trichoderma* y la supresión de *B. cinerea*, garantizando rigor mediante pruebas estadísticas (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey) y asegurando la replicabilidad de los resultados en condiciones estandarizadas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

3.2. Material biológico

Para la obtención de *Trichoderma* spp., se recolectaron muestras de suelo, raíces principales y tallos durante los meses de abril y junio de 2023 en cinco distritos de la región de Tacna, Perú: Tacna Magollo (19K, 361342.42 m E, 7997822.69 m S; 302 m.s.n.m.), Calana (19K, 374574.34 m E, 8015439.04 m S; 875 m.s.n.m.), Pachía (19K, 378017.13 m E, 8021680.15 m S; 1133 m.s.n.m.), Tarata (19K, 391424.08 m E, 8068036.07 m S; 3220 m.s.n.m.) y Palca (19K, 411224.46 m E, 8043196.17 m S; 4510 m.s.n.m.).

La obtención de suelo rizosférico asociado al cultivo de uva de mesa se hizo a partir de una recolección a una profundidad de 20 cm, aproximadamente a un metro de distancia del tallo de las plantas de vid, siguiendo la metodología propuesta por Bustamante *et al.* (2021). Las muestras fueron recolectadas en parcelas de vid ubicadas en los distritos de Tacna, Pachía y Calana, aplicando un diseño de muestreo en forma de cruz “cinco de oros”. La condición principal para la selección de estas parcelas fue la ausencia de aplicaciones de productos a base de *Trichoderma* durante el ciclo del cultivo y en años anteriores (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2025).

También se recolectaron muestras de suelo rizosférico asociadas a *Azorella* sp. en Palca y a *Origanum vulgare* en Tarata, respectivamente. Asimismo, se obtuvieron muestras de raíces y tallos de estas mismas especies vegetales, mediante

un muestreo aleatorio simple, con el propósito de aislar cepas endófitas de *Trichoderma* spp.

Para la obtención de *Botrytis cinerea*, se recolectaron diez racimos de uva de mesa de la variedad Red Globe, con aspecto saludable, provenientes del mercado mayorista Grau (19 K, 366561.67 m E, 8009027.71 m S, 576 m s. n. m.). Los racimos fueron seleccionados aleatoriamente, asegurándose de que su procedencia correspondiera a la región Tacna.

3.3. Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Para el aislamiento de *Trichoderma* spp. de la rizósfera de *Vitis vinifera* y *Origanum vulgare*, se utilizó el método descrito por Zheng *et al.* (2021). Se prepararon tres diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) con 10 g de suelo y 90 mL de agua destilada estéril. Luego, se inocularon 0,1 mL de cada dilución en placas con medio agar papa dextrosa (PDA) (Cat. GM096; Himedia Laboratories; India), suplementado con dos antibióticos (10,000 U de penicilina y 10 mg de estreptomicina) (Ref. 0781, Sigma-Aldrich Inc., EE.UU.), y se sembró por el método de placa extendida. Las placas se incubaron a 25 °C durante 7 días.

Para el aislamiento de *Trichoderma* spp. endófitos de raíces y tallos de *Azorella* sp. y *Origanum vulgare*, se procedió a lo descrito por Wirsal *et al.* (2001). Las raíces se lavaron con agua corriente del grifo y se enjuagaron con agua estéril. Posteriormente, se cortaron en secciones de 2 cm y se incubaron en H₂O₂ al 3 % durante 1 minuto. Luego, las piezas se enjuagaron en agua destilada estéril, se

secaron con papel de toalla estéril y se transfirieron a placas con medio PDA suplementadas con penicilina y estreptomicina. Las placas se incubaron a 25 °C durante 7 días. Para los tallos, se cortaron en secciones similares a las de la raíz, procurando que tengan un espesor de 2 – 3 mm. Luego, se incubaron en hipoclorito de sodio al 5 % durante 3 minutos y se procesaron como se indicó anteriormente.

Las colonias presumiblemente identificadas como *Trichoderma* spp. se seleccionaron con base en sus características culturales, que incluyen su crecimiento rápido sobre PDA, textura algodonosa o fibrosa, coloración blanca inicialmente que cambia a tonos verde claro o verde oscuro conforme avanza la esporulación, y bordes de colonia bien definidos. Estas colonias se transfirieron a nuevas placas con PDA suplementadas con penicilina y estreptomicina para su purificación.

3.4. Caracterización morfológica y fisiológica de *Trichoderma* spp.

3.4.1. Cultivo monospórico

A partir de los crecimientos fúngicos obtenidos, se realizó la purificación mediante el método de cultivo monospórico descrito por French & Hebert (1980). El procedimiento consistió en sembrar 100 µL de una suspensión de 10⁵ conidios/mL de *Trichoderma* por el método de disseminación en superficie sobre el medio Agar Agua (20 g agar, 1L de agua destilada), seguido de una incubación a 25 °C durante 24 horas. Tras la incubación, se identificó un conidio individual germinado, cuyo tubo germinativo era igual o mayor al doble del diámetro del

conidio. Con la ayuda de un microscopio óptico (Leica DM750; Leica Microsystems, Alemania), se extrajo un bloque de agar que contenía el conidio germinado. Este fragmento se transfirió a una placa con medio PDA suplementado con penicilina y estreptomycinina y se incubó a 25 °C por 5 días.

3.4.2. Evaluación de la tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento se determinó mediante el cultivo de cada aislado de *Trichoderma* en cuatro medios diferentes y a 5 temperaturas. Los medios de cultivo fueron PDA, agar harina de maíz con dextrosa (CMD) (Cat. M150; Himedia Laboratories; India), agar extracto de malta con peptona micológica (MEA) (Cat. M137; HiMedia Laboratories, India) y agar sintético de bajo contenido en nutrientes (SNA) (1 g KH₂PO₄, 1 g KNO₃, 0,5 g MgSO₄, 0,5 g KCl, 0,2 g glucosa, 0,2 g sacarosa, 15 g agar, 1 L de agua destilada), suplementadas con penicilina y estreptomycinina. Las temperaturas empleadas fueron 15, 20, 25, 30 y 35 °C. Se tomaron discos de 5 mm de cada aislado con 3 días de crecimiento, y se colocaron a 1 cm del borde de una placa de 100 mm. Las mediciones se realizaron con un vernier cada 24 horas. La tasa de crecimiento se calculó siguiendo la fórmula (1) (Filizola *et al.*, 2019):

$$GR = \frac{G_2 - G_1}{T_2 - T_1} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

GR: Tasa de crecimiento

G₂: Crecimiento después de 48 horas (mm)

G₁: Crecimiento después de 24 horas (mm)

T₂: Tiempo final de 48 horas

T₁: Tiempo inicial de 24 horas

3.4.3. Caracterización cultural y microscópica

Para la caracterización cultural, se evaluaron los cultivos obtenidos de la evaluación de tasa de crecimiento en medio PDA incubados a 25 °C (sección 3.4.2.). Se observaron características como el color del anverso y reverso, textura, pigmentación, patrón de crecimiento, esporulación y presencia o ausencia de pústulas (Bisset, 1991; Chaverri & Samuels, 2003; Kumar *et al.*, 2011; Samuels *et al.*, 2012). Las observaciones microscópicas se realizaron con un microscopio óptico Leica DM750, midiendo los conidios, fiálides y clamidosporas.

3.5. Aislamiento de *Botrytis cinerea*

El aislamiento de *Botrytis cinerea* se realizó según lo descrito por Hatem *et al.* (2023). Se utilizaron cámaras húmedas para inducir el desarrollo de *B. cinerea* a partir de racimos de uva de mesa variedad Red Globe. Para ello, se colocaron secciones de racimos en recipientes estériles y se incubaron durante 10 días a temperatura ambiente. Tras la incubación, se observaron las manifestaciones típicas de moho gris en los tejidos. Utilizando un asa micológica estéril, se tomaron fragmentos de tejido con desarrollo de conidios y se transfirió a placas con medio PDA suplementadas con penicilina y estreptomicina. Las placas se incubaron en

oscuridad durante 7 días a 25 °C. Posteriormente, se hicieron repiques sucesivos y se realizó la técnica del cultivo monospórico para la purificación del fitopatógeno.

Adicionalmente, se realizó una prueba de sensibilidad al tebuconazol mediante la técnica del alimento envenenado, descrita por Dhingra & Sinclair (1995) y adaptada por Zhang *et al.* (2020). Se estimaron las concentraciones efectivas que resultaron en la inhibición del crecimiento micelial del 50 % (EC₅₀) y 90 % (EC₉₀) en medio PDA, en comparación con el control sin tebuconazol. Para ello, se tomaron discos de *B. cinerea* de 5 mm de diámetro, provenientes de cultivos con 5 días de crecimiento, y se colocaron en el centro de placas con PDA suplementado con tebuconazol a concentraciones de 0,05; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5 y 10 (µg/mL). Todos los tratamientos se incubaron a 25 °C en oscuridad, con tres réplicas por tratamiento. El experimento acabó cuando el control estuvo por llenar completamente la placa. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (PICM) con la fórmula (2) (Pandey *et al.*, 1982):

$$\text{PICM} = \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

D_c: Promedio del diámetro de la colonia fúngica en control

D_t: Promedio del diámetro de la colonia fúngica en tratamiento

3.6. Identificación molecular y análisis filogenético multilocus de *Trichoderma* spp. y *Botrytis cinerea*

3.6.1. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación de loci *g3pdh*, *hsp60* y *rpb2* de *Botrytis cinerea*

Se realizó la extracción de ADN a partir de 100 mg de micelio, con 5 días de crecimiento en PDA suplementado con penicilina y estreptomicina, utilizando el kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep (Cat. D6005; Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se cuantificó con un fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), y la calidad, con la relación de absorbancias 260/280, utilizando un espectrofotómetro de microplacas BioTek Epoch 2 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.).

Los loci *g3pdh*, *hsp60* y *rpb2* se amplificaron utilizando los cebadores detallados en la Tabla 1. La PCR se ejecutó en un termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE. UU.), con una mezcla de reacción que contenía 2 µL de ADN molde (~10 ng), 12,5 µL de GoTaq® G2 Green Master Mix 2X (Cat. M7823; Promega, Madison, WI, EE. UU.), 9,5 µL de agua libre de nucleasas y 0,5 µL de cada cebador a 10 µM, completando un volumen total de 25 µL. El protocolo de PCR incluyó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos; recocido (55 °C para *g3pdh*, 54,3 °C para *hsp60* y 49 °C para *rpb2*) durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto, con una extensión final a 72 °C

durante 5 minutos. La presencia y el tamaño de los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. Se tiñeron con GelRed® Nucleic Acid Stain 10000X (Cat. SCT123; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y se visualizaron bajo luz UV con un sistema de documentación de gel omniDOC (SKU OMNIDOC; Cleaver Scientific, Rugby, Reino Unido). Los productos de PCR fueron secuenciados por Psomagen, Inc. (Psomagen, Rockville. MD, EE.UU.), y las secuencias de consenso se obtuvieron del ensamblaje de las cadenas directa e inversa utilizando BioEdit v7.7.1 (Hall, 1999).

Tabla 1*Cebadores específicos utilizados para la amplificación de los loci g3pdh, hsp60 y rpb2*

Código de barras de loci de ADN para <i>Botrytis</i>			
	<i>g3pdh</i>	<i>hsp60</i>	<i>rpb2</i>
	G3PDHfor	HSP60for	RPB2for
	ATTGACATCGTCGCTGTCAACGA	CAACAATTGAGATTTGCCACAAG	GATGATCGTGATCATTTCGG
Cebadores	G3PDHrev	HSP60rev	RPB2rev
(5' - 3')	ACCCCACTCGTTGTCGTACCA	GATGGATCCAGTGGTACCGAGCAT	CCCATAGCTTGCTTACCCAT
	(Staats <i>et al.</i> , 2005)	(Staats <i>et al.</i> , 2005)	(Staats <i>et al.</i> , 2005)

3.6.2. Análisis filogenético multilocus de *Botrytis cinerea*

La filogenia se reconstruyó con secuencias de los loci *g3pdh*, *hsp60* y *rpb2*. Para cada locus analizado, se obtuvieron secuencias estrechamente relacionadas a los aislados mediante búsquedas BLAST del NCBI (Altschul *et al.*, 1990) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, consultado el 18 de marzo del 2025), y las secuencias correspondientes se recuperaron de la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, consultado el 18 de marzo del 2025). Los números de acceso de las secuencias utilizadas se presentan en la Tabla 2.

El conjunto de secuencias para cada locus se alineó individualmente en Muscle v5.3 (Edgar, 2021). Posteriormente, los alineamientos fueron curados con BMGE v1.12_1, implementado en NGPhylogeny (Lemoine *et al.*, 2019) (<https://ngphylogeny.fr/>, consultado el 18 de marzo del 2025) con los parámetros predeterminados. Adicionalmente, se realizó una edición manual en Mesquite v3.81 (Maddison & Maddison, 2023), eliminando los segmentos en las posiciones 885-878 y 6-1; 969-967 de las matrices *g3pdh* y *hsp60*, respectivamente. Luego, se concatenaron y se exportó en formato Phylip en SequenceMatrix v1.8.2 (Vaidya *et al.*, 2011).

Los análisis filogenéticos y el cálculo del modelo de sustitución de nucleótidos se realizaron en la plataforma CIPRES ScienceGateway (Miller *et al.*, 2010) (<https://www.phylo.org/>, consultado el 18 de marzo del 2025). La inferencia filogenética de máxima verosimilitud (ML) se realizó IQ-TREE v.2.4.0 (Nguyen *et*

al., 2015; Hoang *et al.*, 2018; Minh *et al.*, 2020), utilizando 5000 réplicas de bootstrap ultrarápido. jModelTest2 v.2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) se utilizó para la búsqueda del mejor modelo de sustitución según el criterio de información de Akaike. La inferencia bayesiana (BI) se realizó mediante un análisis particionado por loci en MrBayes on ACCESS v3.2.7a (Ronquist *et al.*, 2012). Las búsquedas de las cadenas Markov y Monte Carlo (MCMC), acopladas al algoritmo de Metrópolis, se ejecutaron durante 20 millones de generaciones, muestreando cada 1000 generaciones. Se realizaron dos corridas independientes con cuatro cadenas cada uno (tres calientes y una fría) hasta alcanzar una distribución estacionaria. El primer 25 % de árboles se excluyó como fase de quemado, y los valores de probabilidad posterior se estimaron con el 75 % de árboles restantes. jModelTest2 se utilizó para la búsqueda del mejor modelo de sustitución para cada locus según el criterio de información de Akaike. La convergencia de las verosimilitudes logarítmicas se confirmó utilizando TRACER v1.7.2 (Rambaut *et al.*, 2018). El árbol filogenético resultante se visualizó en FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2010) y se editó Inkscape v1.2.2.

Tabla 2

Números de acceso a Genbank de cepas utilizadas para inferencia filogenética de Botrytis

Especie	Cepa	<i>g3pdh</i>	<i>hsp60</i>	<i>rpb2</i>
<i>Botrytis aclada</i>	MUCL8415	AJ704992	AJ716050	AJ745664
<i>B. alli</i>	MUCL403	AJ704996	AJ716055	AJ745666
<i>B. byssoidea</i>	MUCL94 ^T	AJ704998	AJ716059	AJ745670
<i>B. byssoidea</i>	OnionBC-76	FJ169652	FJ169661	FJ169681
<i>B. californica</i>	X1487	KJ937073	KJ937063	KJ937053
<i>B. californica</i>	X655 ^T	KJ937069	KJ937059	KJ937049
<i>B. calthae</i>	CBS175.63	AJ704999	AJ716060	AJ745671
<i>B. calthae</i>	MUCL1089	AJ705000	AJ716061	AJ745672
<i>B. caroliniana</i>	PN40	OP019701	OP019699	ON887326
<i>B. cinerea</i>	J029	PP942926	PP942927	PP942929
<i>B. cinerea</i>	B-9	MT300295	MT300299	MT300303

<i>B. cinerea</i>	J029	PP942926	PP942927	PP942929
<i>B. cinerea</i>	B-9	MT300295	MT300299	MT300303
<i>B. convoluta</i>	MUCL11595	AJ705008	AJ716069	AJ745680
<i>B. croci</i>	MUCL436	AJ705009	AJ716070	AJ745681
<i>B. deweyae</i>	CBS 134649 = B1	HG799521	HG799519	HG799518
<i>B. elliptica</i>	BE9714	AJ705012	AJ716073	AJ745684
<i>B. euroamericana</i>	B83	KC191677	KC191678	KC191679
<i>B. fabae</i>	CBS109.57	AJ705013	AJ716074	AJ745685
<i>B. fabae</i>	MUCL98 ^T	AJ705014	AJ716075	AJ745686
<i>B. fabiopsis</i>	BroadbeanBC-30	EU563106	EU563097	EU563117
<i>B. fabiopsis</i>	BroadbeanBC-13	EU563109	EU563100	EU563115
<i>B. ficariarum</i>	CBS176.63 ^T	AJ705015	AJ716076	AJ745687
<i>B. fragariae</i>	U14_P1	KX429699	KX429692	KX429706
<i>B. fragariae</i>	D11_H_R4	KX429702	KX429695	KX429709

<i>B. galanthina</i>	MUCL435	MT360709	AJ716079	AJ745689
<i>B. galanthina</i>	MUCL3204	AJ705017	AJ716078	AJ745690
<i>B. gladiolorum</i>	9701	AJ705019	AJ716080	AJ745691
<i>B. gladiolorum</i>	MUCL3865	AJ705020	AJ716081	AJ745692
<i>B. globosa</i>	MUCL444	AJ705022	AJ716083	AJ745693
<i>B. globosa</i>	MUCL21514	AJ705021	AJ716082	AJ745694
<i>B. hyacinthi</i>	MUCL442	AJ705024	AJ716085	AJ745696
<i>B. medusae</i>	B-555 ^T	MH732861	MH732866	MH732870
<i>B. narcissicola</i>	MUCL18857	AJ705025	AJ716086	AJ745698
<i>B. narcissicola</i>	MUCL2120	AJ705026	AJ716087	AJ745697
<i>B. paeoniae</i>	MUCL16084	AJ705028	AJ716089	AJ745700
<i>B. paeoniae</i>	0003	AJ705027	AJ716088	AJ745699
<i>B. pelargonii</i>	MUCL1152	AJ705029	AJ716090	AJ745701
<i>B. polyblastis</i>	CBS287.38 ^T	-	AJ716091	AJ745702

<i>B. polyblastis</i>	MUCL21492	-	AJ716092	AJ745703
<i>B. polygoni</i>	Poly-1	MG846496	MG846501	MG846506
<i>B. polygoni</i>	Poly-2	MG846497	MG846502	MG846507
<i>B. porri</i>	MUCL3234 ^T	AJ705032	AJ716093	AJ745704
<i>B. porri</i>	MUCL3349	AJ705033	AJ716094	AJ745705
<i>B. prunorum</i>	Kw 2.2.2	KX196312	KX196316	KX196314
<i>B. prunorum</i>	BPC1	MN327621	MN327633	MN327624
<i>B. pseudocinerea</i>	10091	MT360716	JN692400	JN692428
<i>B. pseudocinerea</i>	YC-7	MF461633	MF461634	MF461635
<i>B. pyriformis</i>	SedsarBC-1	MT360730	KJ543488	KJ543492
<i>B. pyriformis</i>	SedsarBC-3	MT360732	KJ543490	KJ543494
<i>B. ranunculi</i>	CBS178.63 ^T	AJ705034	AJ716095	AJ745706
<i>B. sinoallii</i>	LeekBC-18	FJ169651	FJ169660	FJ169679
<i>B. sinoviticola</i>	GBC-5	JN692413	JN692399	JN692427

<i>B. sinoviticola</i>	GBC-7-2	JN692406	JN692392	JN692420
<i>B. sphaerosperma</i>	MUCL21481	AJ705035	AJ716096	AJ745708
<i>B. sphaerosperma</i>	MUCL21482	AJ705036	AJ716097	AJ745709
<i>B. squamosa</i>	PRI026	AJ705039	AJ716100	AJ745707
<i>B. squamosa</i>	MUCL1107	AJ705037	AJ716098	AJ745710
<i>B. tulipae</i>	BT9830	AJ705041	AJ716102	AJ745713
<i>B. tulipae</i>	BT9001	AJ705040	AJ716101	AJ745712
<i>Monilinia fructigena</i>	9201	AJ705043	AJ716047	AJ745715
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	D13	PP429295	PP429290	OR818445

Nota. La letra ^T indica cultivo tipo. La letra ^H indica cultivo holotipo.

3.6.3. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación de loci ITS, *tef1* y *rpb2* de *Trichoderma* spp.

Se realizó la extracción de ADN a partir de 100 mg de micelio, con 3 días de crecimiento en PDA suplementado con penicilina y estreptomicina, utilizando el kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep (Cat. D6005; Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se cuantificó con un fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), y la calidad, con la relación de absorbancias 260/280 utilizando un espectrofotómetro de microplacas BioTek Epoch 2 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.).

Los loci ITS, *tef1* y *rpb2* se amplificaron utilizando los cebadores detallados en la Tabla 3. La PCR se ejecutó en un termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE. UU.), con una mezcla de reacción que contenía 2 µL de ADN molde (~10 ng), 12,5 µL de GoTaq® G2 Green Master Mix 2X (Cat. M7823; Promega, Madison, WI, EE. UU.), 9,5 µL de agua libre de nucleasas y 0,5 µL de cada cebador a 10 µM (100 µM para *rpb2*), completando un volumen total de 25 µL. El protocolo de PCR incluyó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 32 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos; recocido (53 °C para ITS y 55 °C para *rpb2* y *tef1*) durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto, con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. La presencia y el tamaño de los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. Se tiñeron con GelRed® Nucleic Acid Stain 10000X (Cat.

SCT123; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y se visualizaron bajo luz UV con un sistema de documentación de gel omniDOC (SKU OMNIDOC; Cleaver Scientific, Rugby, Reino Unido). Los productos de PCR fueron secuenciados por Psomagen, Inc. (Psomagen, Rockville. MD, EE.UU.), y las secuencias de consenso se obtuvieron del ensamblaje de las cadenas directa e inversa utilizando BioEdit v7.7.1 (Hall, 1999).

Tabla 3*Cebadores específicos utilizados para la amplificación de los loci ITS, tef1 y rpb2*

Código de barras de loci de ADN para <i>Trichoderma</i>			
	ITS	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>
	ITS5	fRPB2-5F	EF1-728F
	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
Cebadores			TEF1LLErev
(5' - 3')	ITS4	fRPB2-7cR	AACTTGCAGGCAATGTGG
	TCCTCCGCTTATTGATATGC	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	(Carbone & Kohn, 1998; Jaklitsch
	(White <i>et al.</i> , 1990)	(Liu <i>et al.</i> , 1999)	<i>et al.</i> , 2005)

3.6.4. Análisis filogenético multilocus de *Trichoderma* spp.

La filogenia se reconstruyó con secuencias de los loci ITS, *rpb2* y *tef1*. Para cada locus analizado, se obtuvieron secuencias estrechamente relacionadas a los aislados mediante búsquedas BLAST del NCBI (Altschul *et al.*, 1990) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, consultado el 18 de marzo del 2025), y las secuencias correspondientes se recuperaron de la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, consultado el 18 de marzo del 2025). Los números de acceso de las secuencias utilizadas se presentan en la Tabla 4.

El conjunto de secuencias para cada locus se alineó individualmente en Muscle v5.3. (Edgar, 2021). Posteriormente, los alineamientos fueron curados con BMGE v1.12_1, implementado en NGPhylogeny (Lemoine *et al.*, 2019) (<https://ngphylogeny.fr/>, consultado el 18 de marzo del 2025) con los parámetros predeterminados. Adicionalmente, se realizó una edición manual en Mesquite v3.81 (Maddison & Maddison, 2023), eliminando los segmentos en las posiciones 574-568, 535, 421-418, 194-176, 161-156, 81, 17-1; 1087-1075, 12-1; 1158-1148, 367, 354, 340-338, 154-150, 148-119, 107, 102-99, 80-79, 74, 59, 43, 27-16, 10-1, para las matrices ITS, *rpb2* y *tef1*, respectivamente. Luego, se concatenaron y se exportó en formato Phylip en SequenceMatrix v1.8.2 (Vaidya *et al.*, 2011).

Los análisis filogenéticos y el cálculo del modelo de sustitución de nucleótidos se realizaron en la plataforma CIPRES ScienceGateway (Miller *et al.*, 2010) (<https://www.phylo.org/>, consultado el 18 de marzo de 2025). La inferencia

filogenética de máxima verosimilitud (ML) se realizó IQ-TREE v.2.4.0 (Nguyen *et al.*, 2015; Hoang *et al.*, 2018; Minh *et al.*, 2020), utilizando 5000 réplicas de bootstrap ultrarápido. jModelTest2 v.2.1.10 se empleó para la búsqueda del mejor modelo de sustitución según el criterio de información de Akaike. La inferencia bayesiana (BI) se realizó mediante un análisis particionado por loci en MrBayes on ACCESS v3.2.7a (Ronquist *et al.*, 2012). Las búsquedas de las cadenas Markov y Monte Carlo (MCMC), acopladas al algoritmo de Metrópolis, se ejecutaron durante 20 millones de generaciones, muestreando cada 1000 generaciones. Se realizaron dos corridas independientes con cuatro cadenas cada uno (tres calientes y una fría) hasta alcanzar una distribución estacionaria. El primer 25 % de árboles se excluyó como fase de quemado, y los valores de probabilidad posterior se estimaron con el 75 % de árboles restantes. jModelTest2 se utilizó para la búsqueda del mejor modelo de sustitución para cada locus según el criterio de información de Akaike. La convergencia de las verosimilitudes logarítmicas se confirmó utilizando TRACER v1.7.2 (Rambaut *et al.*, 2018). El árbol filogenético resultante se visualizó en FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2010) y se editó Inkscape v1.2.2.

Tabla 4

Números de acceso a Genbank de cepas utilizadas para inferencia filogenética de Trichoderma

Especies	Cepa	ITS	<i>tef1</i>	<i>rpb2</i>
<i>Trichoderma acremoniooides</i>	11398	-	MH612375	MH612369
<i>T. acremoniooides</i>	11585	-	MH612374	MH612368
<i>T. afarasin</i>	DIS 314F	FJ442259	FJ463400	FJ442778
<i>T. afarasin</i>	DIS 377a	FJ442665	FJ463322	FJ442799
<i>T. afroharzianum</i>	Tafum1	MT102401	MT081431	MT118246
<i>T. afroharzianum</i>	CBS 466.94	KP009262	KP008851	KP009150
<i>T. afroharzianum</i>	Tahz03	-	OR039795	OR039789
<i>T. afroharzianum</i>	T22	-	KP008850	KP009145
<i>T. alboviride</i>	HMAS 247224 = TC916	-	MF371230	MF371215
<i>T. anisohamatum</i>	YMF1.00333 ^T	MH113926	MH177912	MH155272
<i>T. anisohamatum</i>	YMF1.00253	MH262586	MH236495	MH262578

<i>T. aquatica</i>	YMF 1.04625 ^T	-	MK775507	MK775512
<i>T. aquatica</i>	YMF 1.04624	-	MK775506	MK775511
<i>T. asiaticum</i>	YMF1.00168	MH262582	MH236492	MH262575
<i>T. asiaticum</i>	YMF1.00352 ^T	MH113930	MH183183	MH158994
<i>T. asperelloides</i>	a67	-	ON934334	ON934369
<i>T. asperelloides</i>	a105	-	ON934347	ON934382
<i>T. asperellum</i>	CHE-CNRCB 1248	PQ679353	PQ699776	PQ699777
<i>T. asperellum</i>	CHE-CNRCB 1249	PQ679354	PQ699778	PQ699779
<i>T. atrobrunneum</i>	T17-27	-	MW232537	MW232508
<i>T. atrobrunneum</i>	T17-20	-	MW232532	MW232504
<i>T. atroviride</i>	TRW	KX538952	KX538956	KX538954
<i>T. atroviride</i>	SB6	KX538951	KX538955	KX538953
<i>T. bannaense</i>	HMAS:248840 ^T = TC564	KY687923	KY688037	KY687979
<i>T. bannaense</i>	HMAS:248865 = TC943	KY687948	KY688038	KY688003

<i>T. breve</i>	HMAS:248844 ^T = TC735	KY687927	KY688045	KY687983
<i>T. breve</i>	HMAS:248845 = TC736	KY687928	KY688046	KY687984
<i>T. citrinoviride</i>	S20 = WU:32173	-	KJ665449	KJ665250
<i>T. citrinoviride</i>	S27	-	KJ665450	KJ665251
<i>T. effusum</i>	DAOM:230007 ^T = C.P.K. 254	DQ083008	KJ665473	KJ665260
<i>T. eijii</i>	HMAS:252876 = 8161	KJ783307	KJ634775	KJ634742
<i>T. eijii</i>	HMAS:266644 = 8150	KJ783305	KJ634773	KJ634740
<i>T. flavescens</i>	HMJAU 34730 ^T = 130	-	KU235485	KU235486
<i>T. flavescens</i>	HMJAU 34654 = 54	-	KX765305	KX765304
<i>T. gamsii</i>	CC01	OR511997	OR514824	OR514827
<i>T. gamsii</i>	TW20050	KU523894	KU523895	KU523896
<i>T. guizhouense</i>	HV-2014j	-	KF134799	KF134791
<i>T. guizhouense</i>	S628	-	KJ665511	KJ665273
<i>T. hamatum</i>	S397	-	JN715614	JN715601

<i>T. hamatum</i>	Hypo 647 = WU:31629	-	KJ665513	KJ665274
<i>T. harzianum</i>	P3413	-	PV081259	PV081366
<i>T. harzianum</i>	P3444	-	PV081269	PV081376
<i>T. hispanicum</i>	CBS:130540 ^T = WU:31606 = S453	JN715595	JN715659	JN715600
<i>T. inconspicuum</i>	YMF 1.04623 ^T	MK795993	MK795985	MK795989
<i>T. insigne</i>	YMF1.00207 ^T	MH113925	MH177911	MH155271
<i>T. insigne</i>	YMF1.00272	MH113927	MH177913	MH155274
<i>T. longibrachiatum</i>	TRS764	KP009314	KP008877	KP009197
<i>T. longibrachiatum</i>	S328	JQ685875	JQ685867	KJ665291
<i>T. obovatum</i>	YMF 1.06211 ^T	MN977803	MT070144	MT038432
<i>T. obovatum</i>	YMF 1.6190	-	MT070143	MT038433
<i>T. orientale</i>	CBS:131488 = S187	JQ685873	JQ685868	JQ685884
<i>T. orientale</i>	E589	-	ON934364	ON934399
<i>T. parareesei</i>	CP55_3	-	MW541129	MW541109

<i>T. parareesei</i>	CP10_3	-	MW541128	MW541108
<i>T. paratroviride</i>	JZBQT5Z4	-	ON649925	ON649978
<i>T. paratroviride</i>	JZBQT5Z6	-	ON649926	ON649979
<i>T. paraviridescens</i>	S36	-	KC285678	KC285766
<i>T. paraviridescens</i>	CBS 119321 ^T = Hypo 372	NR_134367	DQ672610	KC285763
<i>T. pluripenicillatum</i>	YMF 1.06198 ^T	MN977788	MT070159	MT070160
<i>T. pseudokoningii</i>	DAOM:167678 ^T	EU280097	KJ713204	KJ842214
<i>T. pyramidale</i>	CBS:135574 ^T = S73	-	KJ665699	KJ665334
<i>T. pyramidale</i>	T20	KX632513	KX632627	KX632570
<i>T. reesei</i>	G.J.S. 86-404	-	GQ354342	HM182970
<i>T. reesei</i>	G.J.S. 97-177	-	GQ354347	HM182974
<i>T. rifaii</i>	DIS 337F	FJ442621	FJ463321	FJ442720
<i>T. rifaii</i>	CSC22A0494	PQ821598	PQ824590	PQ824594
<i>T. samuelsii</i>	CBS:130537 ^T = WU:31607 = S5	JN715596	JN715651	JN715599

<i>T. samuelsii</i>	S42	JN715593	JN715652	JN715598
<i>T. saturnisporopsis</i>	CBS:128829 ^T = S19	JQ685874	JQ685869	JQ685885
<i>T. saturnisporum</i>	CHE-CNRCB 1141	PQ281436	PQ287386	PQ287390
<i>T. sempervirentis</i>	S599 ^T	-	KC285632	KC285755
<i>T. sempervirentis</i>	S601	-	KC285633	KC285756
<i>T. shaoguanicum</i>	HMAS 248809 = TC826	-	KX428031	KX428049
<i>T. simile</i>	YMF 1.06201 ^T	MN977793	MT070154	MT052184
<i>T. simile</i>	YMF 1.6180	-	MT070153	MT052185
<i>T. sinense</i>	HMAS 252891	-	KX066253	KX066265
<i>T. sinense</i>	HMAS 273771	-	KX066252	KX066264
<i>T. speciosum</i>	YMF1.00205 ^T	MH113929	MH183184	MH155270
<i>T. sphaerosporum</i>	HMAS:273763 ^T = 9755	-	KU529134	KU529145
<i>T. sphaerosporum</i>	HMAS:273764 = 9479	-	KU529135	KU529146
<i>T. subviride</i>	HMAS:273761 ^T = 8658	-	KU529131	KU529142

<i>T. subviride</i>	HMAS:273762 = 8878	-	KU529132	KU529143
<i>T. uncinatum</i>	YMF 1.04622 ^T	MK795994	MK795986	MK795990
<i>T. vermifimicola</i>	CGMCC 3.19694 ^T = HMAS 248255	-	MN605882	MN605871
<i>T. vermifimicola</i>	CGMCC 3.19850	-	MN605881	MN605870
<i>T. viridarium</i>	S136 ^T	-	KC285658	KC285760
<i>T. viridarium</i>	S492	-	KC285662	KC285761
<i>T. viridescens</i>	S1	-	KC285634	KC285757
<i>T. viridescens</i>	S452 ^{ET}	-	KC285646	KC285758
<i>T. viridialbum</i>	CBS:133495 ^T = S250	-	KC285706	KC285774
<i>T. viridialbum</i>	G.J.S. 07-145	-	KC285704	KC285772
<i>T. xixiacum</i>	CGMCC 3.19697 ^T = HMAS 248253	-	MN605885	MN605874
<i>T. xixiacum</i>	CGMCC 3.19698	-	MN605886	MN605875
<i>T. yunnanense</i>	GZG6-1	OQ734748	OQ791405	OQ791403
<i>T. yunnanense</i>	GZG8-3	OQ734749	OQ791406	OQ791404

<i>T. zelobreve</i>	CGMCC 3.19695 ^T = HMAS 248254	-	MN605883	MN605872
<i>T. zelobreve</i>	CGMCC 3.19696	-	MN605884	MN605873
<i>T. zeloharzianum</i>	YMF1.00268 ^T	MH113932	MH183181	MH158996
<i>Protocrea farinosa</i>	CBS 121551 ^{ET}	MH863119	EU703889	EU703935
<i>Protocrea pallida</i>	CBS 299.78 ^{ET}	EU703925	EU703900	EU703948

Nota. La letra ^T indica cultivo tipo. La letra ^H indica cultivo holotipo. Las letras ^{ET} indican cultivo epitipo.

3.7. Prueba de antibiosis

Para determinar la antibiosis de los *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea*, se utilizó la prueba del enfrentamiento dual en placa, según lo descrito por Geng *et al.* (2022). Los aislamientos de *Trichoderma* y *B. cinerea* se cultivaron en placas con PDA de 100 mm suplementadas con penicilina y estreptomicina, durante 3 días a 25 °C. Luego, se cortaron discos de agar de 5 mm de diámetro con un sacabocado. Un disco con el patógeno se inoculó en PDA a 10 mm del borde de la placa, y en el extremo opuesto, un disco con el antagonista. Cada aislado de *Trichoderma* se designó como un tratamiento, con 3 repeticiones. Paralelamente, se estableció un control que solo contenía *B. cinerea*. Todos los tratamientos y el control se incubaron a 25 °C, en oscuridad. Se tomaron las medidas del crecimiento radial de *B. cinerea* diariamente con un vernier. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial se calculó con la siguiente fórmula (3) (Chen *et al.*, 2016):

$$PA = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

PA: antibiosis (%)

R₁: crecimiento radial en ausencia del antagonista (control)

R₂: crecimiento radial en presencia del antagonista

3.8. Prueba de micoparasitismo

Para determinar los aislados de *Trichoderma* con mejor capacidad de micoparasitismo, se utilizó el método de placa pre colonizada descrito por Foley &

Deacon (1985), Krauss *et al.* (1998) y Evans *et al.* (2003), con ciertas modificaciones. Se tomaron discos de 5 mm que contenían *B. cinerea* y se inocularon en un extremo de una placa con PDA suplementado con penicilina y estreptomicina, las cuales se incubaron en oscuridad a 25 °C por 20 días. Luego, se tomaron cortes rectangulares de 5 × 25 mm de los aislamientos de *Trichoderma* con 4 días de crecimiento, y se inocularon en el extremo opuesto de las placas con *B. cinerea*. Todos los tratamientos fueron incubados en condiciones de oscuridad a 25 °C por 15 días. Tras el periodo de incubación, se realizaron cortes de discos desde el extremo inoculado con el patógeno hasta el otro extremo inoculado con el antagonista, obteniendo 10 discos por placa. Los discos de cada placa se inocularon de forma equidistante de 5 en 5 en placas con PDA y fueron incubadas a 25 °C por 3 días. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. El porcentaje de micoparasitismo (PM) se determinó mediante la fórmula (6) (Reyes-Figueroa *et al.*, 2016):

$$PM = \frac{CT}{N} \times 100 \quad (6)$$

Donde:

PM: micoparasitismo (%)

CT: son los discos positivos al crecimiento de *Trichoderma*

N: son los discos totales de una réplica

3.9. Antagonismo potencial

El antagonismo potencial se calculó promediando los resultados de micoparasitismo y antibiosis, según la metodología propuesta por Reyes-Figueroa *et al.* (2016), mediante la fórmula (7):

$$AP = \frac{PM + PA}{2} \quad (7)$$

Donde:

AP: antagonismo potencial

PM: micoparasitismo de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinerea*

PA: antibiosis de *Trichoderma* spp. contra *B. cinerea*

3.10. Efecto inhibitorio de los metabolitos volátiles (MVs)

3.10.1. Efecto inhibitorio *in vitro* de los MVs de *Trichoderma* spp. sobre *B. cinerea*

Para evaluar el efecto inhibitorio de los MVs *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea*, se utilizó la prueba de placa invertida descrita por Dennis & Webster (1971).

Se tomaron discos de 5 mm de cultivos de *Trichoderma* con 4 días de crecimiento y se inocularon en el centro de placas Petri de 90 mm con PDA suplementadas con penicilina y estreptomycin, y se llevaron a incubación en oscuridad a 25 °C por 5 días (Bello *et al.*, 2022). Transcurrido ese tiempo, se tomaron discos de 5 mm con *B. cinerea* con 4 días de crecimiento y se inocularon en el centro de la placa con medio PDA. Para el enfrentamiento, se retiraron las

tapas de las placas cultivadas y se enfrentaron con los antagonistas, colocando a *Trichoderma* en la parte inferior y *B. cinerea* en la superior. Los enfrentamientos fueron sellados con parafilm para evitar el intercambio de gases con el medio externo. El control consistió en un inoculó *B. cinerea* en la parte superior y la inferior sin el antagonista. La prueba se detuvo cuando los controles estuvieron a punto de cubrir la placa. Todos los enfrentamientos se realizaron por triplicado y se incubaron a 25 °C. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó con la fórmula (2).

3.10.2. Efecto inhibitorio in vivo de los MVs de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea

El efecto inhibitorio de los MVs sobre *Botrytis cinerea* se evaluó *in vivo* utilizando cámaras de microfumigación, según lo descrito por Bello *et al.* (2022), con ciertas modificaciones. Se prepararon placas con PDA de 90 mm de diámetro, suplementadas con penicilina y estreptomycinina, y se incubaron con discos de 5 mm con micelio de *Trichoderma* spp. a 25 °C en oscuridad durante 5 días. Luego, las placas se colocaron en recipientes de plástico de 120 mm de diámetro que contenía papel toalla húmedo estéril y una malla metálica estéril de 95 mm de diámetro sobre la placa de 90 mm con el antagonista. Por otro lado, se seleccionaron bayas de uva de mesa variedad Red Globe, sin heridas visibles y de tamaño uniforme, las cuales se desinfectaron en NaClO al 0,5 % y luego en alcohol al 70 %. Se realizó una herida en la zona ecuatorial de cada baya con un tip de micropipeta de 10 µL, a una

profundidad de 2 mm. A cada herida se aplicaron 10 µl de una suspensión de conidios de *B. cinerea* a una concentración de 10^6 conidios/mL. Las bayas infectadas se colocaron sobre la rejilla metálica de la cámara de micofumigación, las cuales se cerraron herméticamente utilizando parafilm. Cada cámara contuvo tres bayas. El control se estableció con bayas heridas, pero sin inóculo del patógeno. Las cámaras fueron incubadas durante 7 días a 25 °C. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial utilizando la fórmula (2).

3.11. Efecto inhibitorio de los metabolitos no volátiles (MNVs)

3.11.1. Obtención de MNVs de Trichoderma spp.

Se utilizó el método descrito por Dennis & Webster (1971) y adaptado por Marques *et al.* (2018), con algunas modificaciones. Los MNVs se obtuvieron cultivando 300 mL de caldo papa dextrosa (PDB) (Cat. GM403; Himedia Laboratories; India) con 8 a 10 discos de 5 mm con micelio de *Trichoderma*, incubados a 25 °C durante 15 días a 150 RPM. Posteriormente, el extracto se separó del micelio mediante filtración con papel Whatman N°1 (Cat. WHAT1001-110; Whatman, Merck Millipore) y se centrifugó a 5000 RPM durante 10 minutos. Finalmente, se realizó un filtrado adicional utilizando un filtro de membrana de 0,22 µm (Cat. C0000524; ALWSCI Labfil, China) en un sistema de filtración al vacío.

3.11.2. Efecto inhibitorio in vitro de los MNVs de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea

Para evaluar el efecto inhibitorio de los MNVs, se aplicó el método del alimento envenenado descrito por Dhingra & Sinclair (1995). Se prepararon placas con PDA suplementado con el extracto de metabolitos de cada aislado de *Trichoderma*, a concentraciones de 30, 40 y 50 % (v/v). En el centro de cada placa se inoculó un disco de 5 mm con micelio de *Botrytis cinerea* con 4 días de crecimiento. El control consistió en placas con PDA sin el extracto. Las mediciones del crecimiento micelial se realizaron cada 24 horas, midiendo dos diámetros perpendiculares de la colonia. Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones y un tratamiento químico con tebuconazol. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con la fórmula (2).

3.11.3. Efecto inhibitorio in vitro de los MNVs de Trichoderma spp. sobre la germinación de conidios de Botrytis cinerea

Para evaluar el efecto *in vitro* de los MNVs sobre la germinación de conidios, se preparó una suspensión de *Botrytis cinerea* con agua destilada estéril y Tween 20 al 0,1 % (v/v), a una concentración de 10^6 conidios/mL. Luego, en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, se mezclaron 100 μ l de esta suspensión con 1000 μ l de extracto de metabolitos correspondiente a cada aislado de *Trichoderma*, en concentraciones de 30, 40 y 50 %. Todos los tratamientos se incubaron a 25 °C por 24 horas. El control contuvo 100 μ l de suspensión de conidios y 1000 μ l de PDB.

Tras la incubación, se colocaron 20 μ L de cada tratamiento sobre un portaobjetos y se contaron 100 conidios utilizando un microscopio óptico Leica DM750. Se consideraron como germinados, aquellos cuyo tubo germinativo superó al menos 2 veces el diámetro mayor del conidio. Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones y un tratamiento con tebuconazol. El porcentaje de inhibición de germinación de conidios (PIGC) se calculó con la fórmula (8) (Skidmore & Dickinson, 1976):

$$\text{PIGC} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (8)$$

Donde:

A₁: número de conidios germinados del patógeno en portaobjetos de control

A₂: número de conidios germinados del patógeno en portaobjetos con tratamiento

3.11.4. Efecto inhibitorio in vivo de los MNVs de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea

Los efectos *in vivo* de los MNVs se evaluaron mediante un ensayo de envenenamiento en bayas de uva de mesa variedad Red Globe. Se seleccionaron bayas de tamaño uniforme y con ausencia de heridas, las cuales fueron desinfectadas con NaClO al 0,5 % y luego con alcohol al 70 %. Posteriormente, se realizó una herida en la zona ecuatorial de cada baya con un tip de micropipeta de 10 μ L, a una profundidad de 2 mm. Las bayas heridas se sumergieron en el extracto de los aislados de *Trichoderma* a concentraciones de 30, 40 y 50 % (v/v) durante 10 minutos. Tras la inmersión, las bayas se secaron y se aplicaron 10 μ L de una suspensión de conidios de *Botrytis cinerea* a 10⁶ conidios/mL sobre cada herida.

Las bayas inoculadas se dispusieron en cámaras húmedas. El experimento se detuvo cuando el micelio de *B. cinerea* cubrió el 50 % de la superficie de la baya. En ese momento, se realizó la medición del crecimiento micelial utilizando un vernier, registrando dos diámetros perpendiculares de la colonia. Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones y un tratamiento químico con tebuconazol. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial con la fórmula (2).

3.12. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado para los ensayos, considerando cada cepa de *Trichoderma* como un tratamiento con tres repeticiones. Los porcentajes de inhibición se transformaron utilizando la transformación angular de Bliss. Se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, y los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Posteriormente, las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) en Minitab v19.1.0.1. Los gráficos de barras de error se generaron en GraphPad Prism v8.2.263.

IV. RESULTADOS

4.1. Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp.

4.1.1. Aislamiento de cepas nativas

Se obtuvieron un total de 118 aislamientos de *Trichoderma* spp., recolectados en diversos puntos de muestreo ubicados en la región de Tacna: Tacna (Magollo), Calana, Pachía, Tarata y Palca. Del total de muestras, 85 correspondieron a aislamientos rizosféricos y 33 a aislamientos endofíticos.

Para su identificación, las muestras se codificaron según su procedencia: **MA** para Tacna (Magollo), **CA** para Calana, **PA** para Pachía, **TI** para Tarata y **AZEN** para Palca. Posteriormente, se seleccionaron aleatoriamente 10 aislamientos representativos en función de sus características morfológicas observadas en cultivos sobre medio PDA. La descripción detallada de estas muestras se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5*Información de aislamientos representativos de Trichoderma spp.*

Código de Aislamiento	Localidad	Origen	Hospedante	Zona UTM	Coordenada Este	Coordenada Sur	Altitud (m.s.n.m.)
PA06	Pachía	Rizosférico	<i>Vitis vinifera</i>	19K	378017,13	8021680,15	1133
CA01	Calana	Rizosférico	<i>Vitis vinifera</i>	19K	374574,34	8015439,04	875
CA07	Calana	Rizosférico	<i>Vitis vinifera</i>	19K	374574,34	8015439,04	875
TI15	Tarata	Endofítico (raíz)	<i>Origanum vulgare</i>	19K	391424,08	8068036,07	3220
MA02	Tacna (Magollo)	Rizosférico	<i>Vitis vinifera</i>	19K	361342,42	7997822,69	302
AZEN06	Palca	Endofítico (raíz)	<i>Azorella</i> sp.	19K	411224,46	8043196,17	4510
AZEN10	Palca	Rizosférico	<i>Azorella</i> sp.	19K	411224,46	8043196,17	4510
AZEN14	Palca	Rizosférico	<i>Azorella</i> sp.	19K	411224,46	8043196,17	4510
AZEN17	Palca	Rizosférico	<i>Azorella</i> sp.	19K	411224,46	8043196,17	4510
AZEN20	Palca	Rizosférico	<i>Azorella</i> sp.	19K	411224,46	8043196,17	4510

Nota. Los aislamientos seleccionados fueron utilizados para el análisis filogenético.

4.1.2. Identificación molecular y análisis filogenético

Se realizó una inferencia filogenética multilocus con las secuencias obtenidas de un total de 110 aislamientos, agrupados en 56 taxones que representan 5 clados de *Trichoderma*. Estos se componen por 33 aislamientos del clado *Harzianum*, 26 aislamientos del clado *Longibrachiatum*, 21 aislamientos del clado *Viridescens*, 10 aislamientos del clado *Atroviride* y 18 aislamientos del clado *Hamatum/Asperellum*, con *Protocrea pallida* CBS 299.78 y *Protocrea farinosa* CBS 121551 como grupo externo. Tras la edición manual de los alineamientos individuales, la matriz de datos incluyó un total de 2656 caracteres (519 para ITS, 1062 para *rpb2* y 1074 para *tef1*).

El análisis en IQ-Tree generó un árbol filogenético con la mejor puntuación, con un valor de ML optimizado de -18163,9888. El modelo de sustitución calculado por jModelTest2 fue TIM3+I+G, con una proporción de sitios invariantes (-i) de 0,5530 y un parámetro de forma de la distribución gamma (-a) de 0,7510. Posteriormente, IQ-Tree optimizó el modelo a TIM3+F+I+G4. Las frecuencias de bases fueron: A = 0,2358, C = 0,2880, G = 0,2522 y T = 0,2232, y tasas de sustitución: AC = 0,7280, AG = 3,1787, AT = 1,0000, CG = 0,7280, CT = 4,7362 y GT = 1,0000. El análisis de BI se ejecutó mediante un análisis particionado por loci. Para ITS, se aplicó el modelo TVM+I+G (-i = 0,5090 y -a = 0,5130), con frecuencias de bases: A = 0,2197, C = 0,3180, G = 0,2497 y T = 0,2126, y tasas de sustitución: AC = 1,0846, AG = 1,7894, AT = 1,6853, CG = 0,4134, CT = 1,7894 y

GT = 1,0000. Para *rpb2*, se aplicó el modelo TIM1+I+G (-i = 0,5720 y -a = 1,8330), con frecuencias de bases: A = 0,2484, C = 0,2701, G = 0,2608 y T = 0,2208, y tasas de sustitución: AC = 1,0000, AG = 4,0987, AT = 0,7478, CG = 0,7478, CT = 7,3688 y GT = 1,0000. Para *tef1*, se aplicó el modelo TPM3uf+I+G (-i = 0,5090 y -a = 0,5130), con frecuencias de bases: A = 0,1998, C = 0,3330, G = 0,2321 y T = 0,2351, y tasas de sustitución: AC = 0,5496, AG = 2,8058, AT = 1,0000, CG = 0,5496, CT = 2,8058 y GT = 1,0000. El árbol filogenético resultante de ML mostró una topología congruente con la obtenida en el análisis de BI.

Los aislamientos AZEN10 y AZEN20 están estrechamente relacionados con *Trichoderma afroharzianum* CBS 466.9, con un soporte estadístico de MLBP/BIPP = 100/0,99. Su proximidad filogenética con esta cepa, en comparación con *T. afroharzianum* Tahz03, Tafum1 y T22, conforman un subclado bien soportado (MLBP/BIPP = 100/1,00) dentro del linaje de *T. afroharzianum*. Los aislamientos AZEN14, AZEN17, CA01 y PA06 están estrechamente relacionados con *Trichoderma longibrachiatum*, con un soporte estadístico de MLBP/BIPP = 100/1,00, lo que respalda su asignación a esta especie. Los aislamientos TI15 y AZEN06 forman un subclado estrechamente relacionado, con un soporte estadístico de MLBP/BIPP = 100/1,00, pero no han sido identificados hasta nivel de especie. Su posición filogenética evidencia una relación cercana a *Trichoderma viridialbum*, aunque constituyen un grupo divergente con un soporte estadístico de MLBP/BIPP = 86/0,99. El aislamiento MA02 está estrechamente relacionado con *Trichoderma*

paratroviride, con un soporte estadístico de $MLBP/BIPP = 100/1,00$, lo que respalda su asignación a esta especie. El aislamiento CA07 está estrechamente relacionado con *Trichoderma asperelloides*, con un soporte estadístico de $MLBP/BIPP = 100/1,00$, lo que respalda su asignación a esta especie (Figura 6).

Figura 6

Árbol filogenético inferido por análisis bayesiano a partir de secuencias concatenadas de ITS, rpb2 y tef1

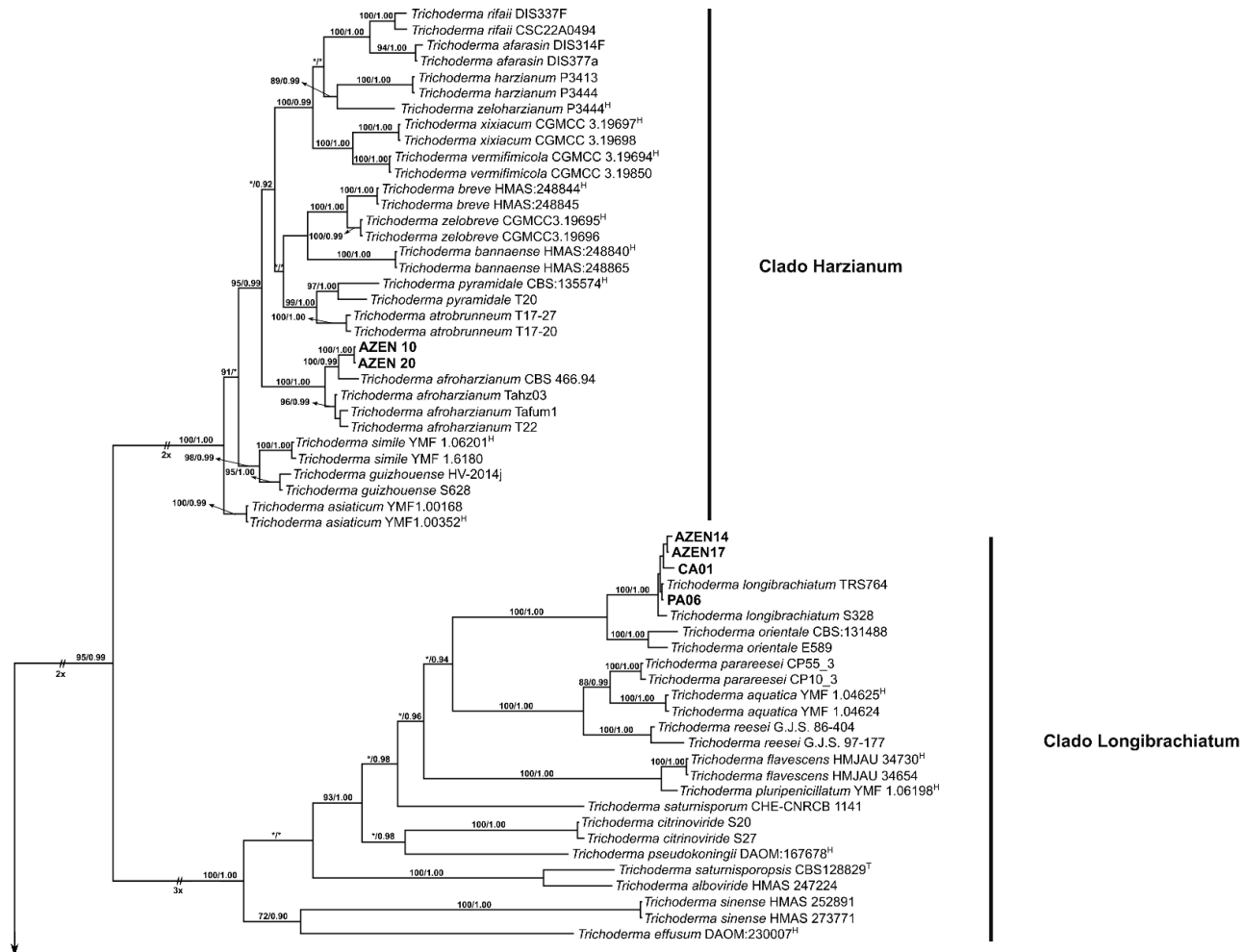
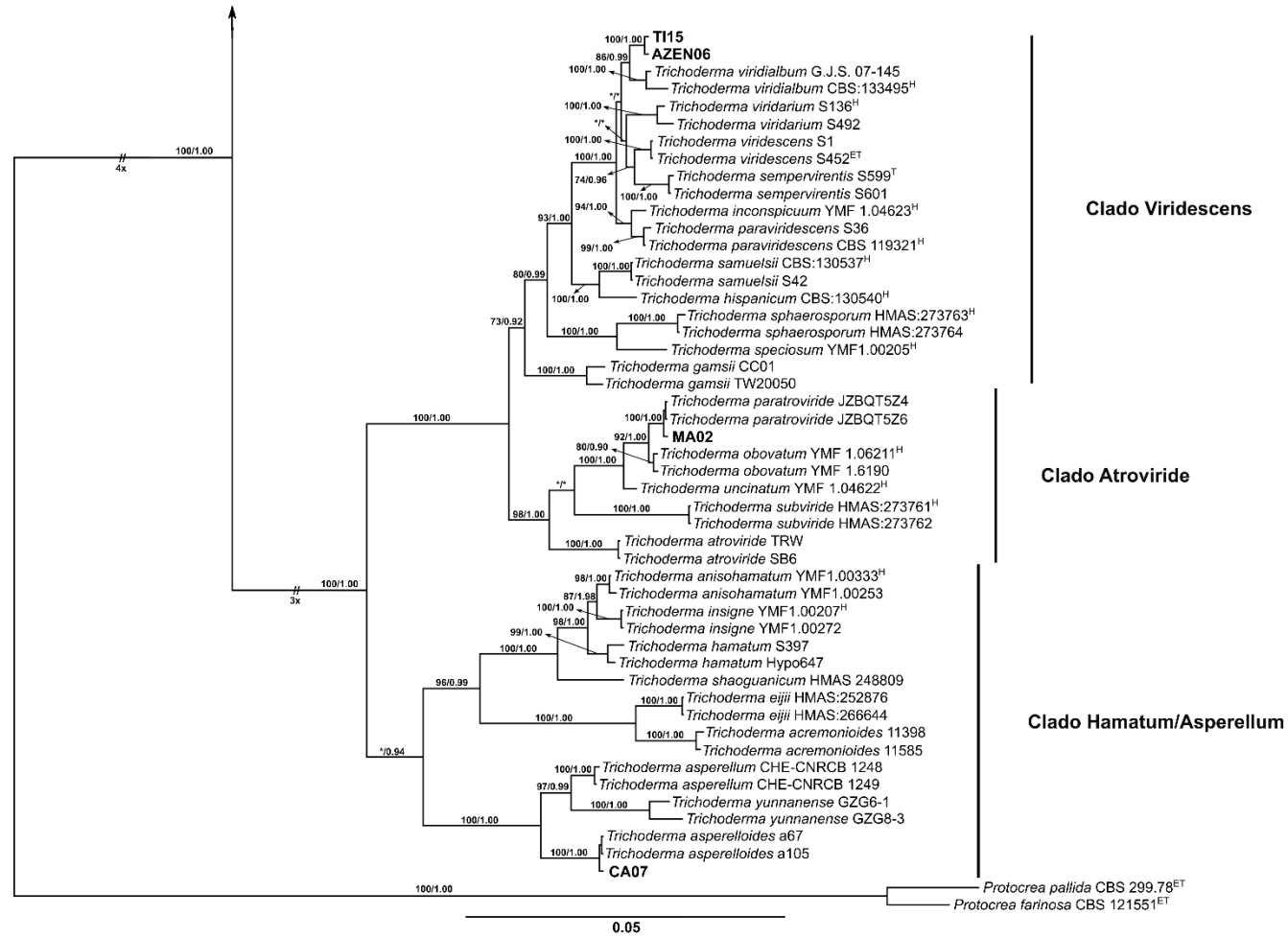


Figura 6 (continuación)



Nota. Árbol filogenético generado mediante el análisis de inferencia bayesiana utilizando las secuencias concatenadas de los loci ITS, *rpb2* y *tef1* del género *Trichoderma*. Los valores de porcentaje de soporte de Bootstrap de Máxima Verosimilitud (MLBP) ≥ 70 % (izquierda) y los valores de Probabilidad Posterior de Inferencia Bayesiana (BIPP) $\geq 0,90$ (derecha) se indican en los nodos. *Protocrea farinosa* CBS 121551 y *Protocrea pallida* CBS 299.78 se seleccionaron como grupo externo. * Indica valores de ML < 70 % y valores de BI $< 0,90$. La letra ^T indica cultivo tipo. La letra ^H indica cultivo holotipo. Las letras ^{ET} indican cultivo epitipo.

4.1.3. Caracterización morfológica y fisiológica

4.1.3.1. *Trichoderma afroharzianum* AZEN 20 y AZEN10

T. afroharzianum mostró patrones de crecimiento dependientes de la temperatura y del medio, con un crecimiento óptimo entre 25 y 30 °C en medios ricos en nutrientes (Figura 7). A 25 °C, las colonias en MEA y PDA alcanzaron tasas de crecimiento rápidas de $22,88 \pm 1,18$ y $22,50 \pm 0,62$ mm/día, respectivamente, colonizando placas de 100 mm en 4 días. A las 72 horas, las colonias en MEA alcanzaron los $68,6 \pm 3,5$ mm, presentando un micelio blanco, denso y algodonoso con estrías radiales, que transicionaba hacia zonas centrales verde oliva debido a una esporulación profusa, mientras que el reverso desarrollaba una pigmentación

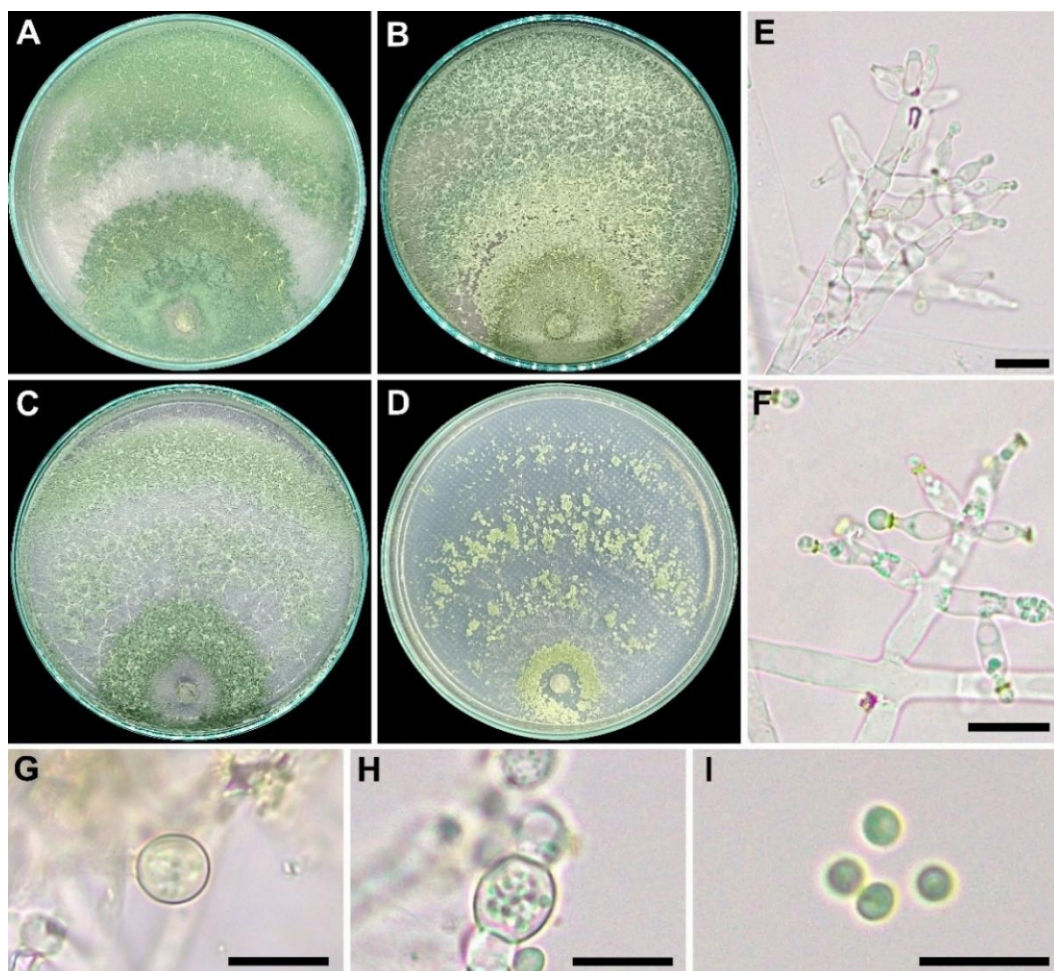
ámbar oscura. En PDA, las colonias ($67,5 \pm 1,9$ mm a las 72 h) mostraron un micelio aéreo y esponjoso con un núcleo verde intenso y un reverso amarillento.

En contraste, los medios pobres en nutrientes (SNA; $19,89 \pm 0,43$ mm/día a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) permitieron un crecimiento más lento ($59,7 \pm 1,3$ mm a las 72 h), produciendo un micelio traslúcido blanco grisáceo con pústulas verdes esporádicas indicativas de esporulación localizada, mientras que el reverso permaneció pálido. A $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, las tasas de crecimiento se mantuvieron elevadas en PDA ($22,81 \pm 1,08$ mm/día) y MEA ($22,78 \pm 0,46$ mm/día), con rasgos morfológicos similares, pero con una esporulación más intensa y pigmentación más oscura. En CMD a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, el crecimiento fue reducido ($19,17 \pm 0,60$ mm/día) y la esporulación irregular, con colonias aplanadas y traslúcidas.

Notablemente, los $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ inhibieron severamente el crecimiento en todos los medios ($6,65$ mm/día en PDA; $3,89$ mm/día en CMD), produciendo un micelio amarillento atrofiado en PDA ($19,9 \pm 8,7$ mm a las 72 h) y colonias escasas y no esporulantes en MEA ($8,3 \pm 1,3$ mm a las 72 h). La diferenciación estructural fue sensible a la temperatura, zonas concéntricas de esporulación dominaron en PDA y MEA a 25 y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, mientras que SNA indujo de forma única micropústulas bajo estrés nutricional.

Microscópicamente, los conidióforos se organizan en pirámides irregulares, ramificados repetidamente, portando fiálides ampuliformes a lageniformes de ($4,9$ - $8,2$ – $10,5$ ($-18,8$) μm de largo por ($2,2$ - $3,2$ – $3,8$ ($-4,7$) μm de ancho en la base,

con cuellos estrechos y base inflada, dispuestas en verticilos de 2 – 4. Estas producen conidias subglobosas, ovoides a elipsoidales de (2,6-) 3,2 – 3,5 (-4,1) μm de largo por (2,5-) 2,8 – 3,0 (-3,4) μm de ancho, de pared lisa y coloración hialina a verde pálido, agrupadas en glóbulos mucilaginosos. Las clamidosporas, son terminales o intercalares, globosas a subglobosas (4,7-) 7,8 – 9,2 (-11,0) μm de largo por (4,4-) 6,9 – 8,1 (-10,4) μm de ancho, con paredes engrosadas y superficie ligeramente verrugosa, formándose preferentemente en medios pobres (SNA) a 25°C.

Figura 7*Caracterización morfológica de Trichoderma afroharzianum*

Nota. Cultivos A – D de *T. afroharzianum* en diferentes medios a 25 °C tras 7 días en oscuridad (A en PDA, B en MEA, C en CMD, D en SNA). Las estructuras anamorfas fueron observadas en medio PDA. E – F conidióforos y fiálides, G clamidospora terminal, H clamidospora intercalar, I conidias. Barras de escala: 10 μm (E – I).

4.1.3.2. *Trichoderma longibrachiatum* PA06, CA01, AZEN 14 y AZEN17

T. longibrachiatum mostró un crecimiento rápido y diferenciado según la temperatura y el medio de cultivo (Figura 8). En medios ricos como MEA y PDA, las tasas de crecimiento fueron elevadas, colonizando completamente placas (100 mm) en menos de 5 días a temperaturas entre 25 y 35 °C.

A 25 °C, *T. longibrachiatum* mostró un crecimiento moderado en los cuatro medios evaluados. En MEA, el micelio alcanzó los $84,65 \pm 2,11$ mm a las 72 h, cubriendo completamente la placa a los 4 días. La tasa de crecimiento fue de $28,22 \pm 0,71$ mm/día. Las colonias presentaron un micelio aéreo blanco denso, con conidiación verde esmeralda en el centro y reverso amarillo pálido. En PDA, el crecimiento fue de $79,12 \pm 2,75$ mm en 72 h (cubrió completamente la placa en 4 días), con una tasa de $26,36 \pm 1,25$ mm/día, observándose zonación concéntrica, micelio blanco-grisáceo, conidiación verde oliva periférica y reverso beige. En CMD, se observó un menor desarrollo ($55,67 \pm 1,12$ mm en 72 h; 5 días para cubrir la placa), con una tasa de $18,59 \pm 0,37$ mm/día, mostrando colonias translúcidas, con micelio aéreo escaso y esporulación retardada en parches concéntricos, y reverso incoloro. Finalmente, en SNA se registró un crecimiento de $55,82 \pm 1,45$ mm en 72 h (5 días para cubrir la placa), con una tasa de $18,64 \pm 0,48$ mm/día, caracterizado por colonias planas, micelio basal hialino y mínima esporulación en pequeños agregados verdes, con reverso transparente.

A 30 °C, se observó un crecimiento más acelerado. En MEA, el micelio alcanzó los $90,83 \pm 1,25$ mm en 72 h, cubriendo totalmente la placa a los 3 días, con una tasa de crecimiento de $33,61 \pm 0,75$ mm/día. Las colonias presentaron una conidiación intensa y homogénea de color verde oscuro, micelio compacto y reverso amarillo brillante. En PDA, se alcanzaron $88,12 \pm 2,71$ mm en 72 h (cubriendo la placa a los 3,5 días), con una tasa de $29,34 \pm 0,97$ mm/día, con zonación marcada, conidiación en bandas verde oscuras y reverso amarillo fosforescente. En CMD, el crecimiento fue de $74,12 \pm 2,18$ mm en 72 h (cubriendo la placa a los 4 días), con una tasa de $24,67 \pm 1,06$ mm/día, presentando micelio basal plano, conidiación irregular y reverso ligeramente ámbar. En SNA, se observó un crecimiento de $78,35 \pm 1,25$ mm en 72 h (cubriendo la placa a los 4 días), con una tasa de $26,05 \pm 0,75$ mm/día, con colonias que mostraron esporulación dispersa de color verde y reverso cristalino.

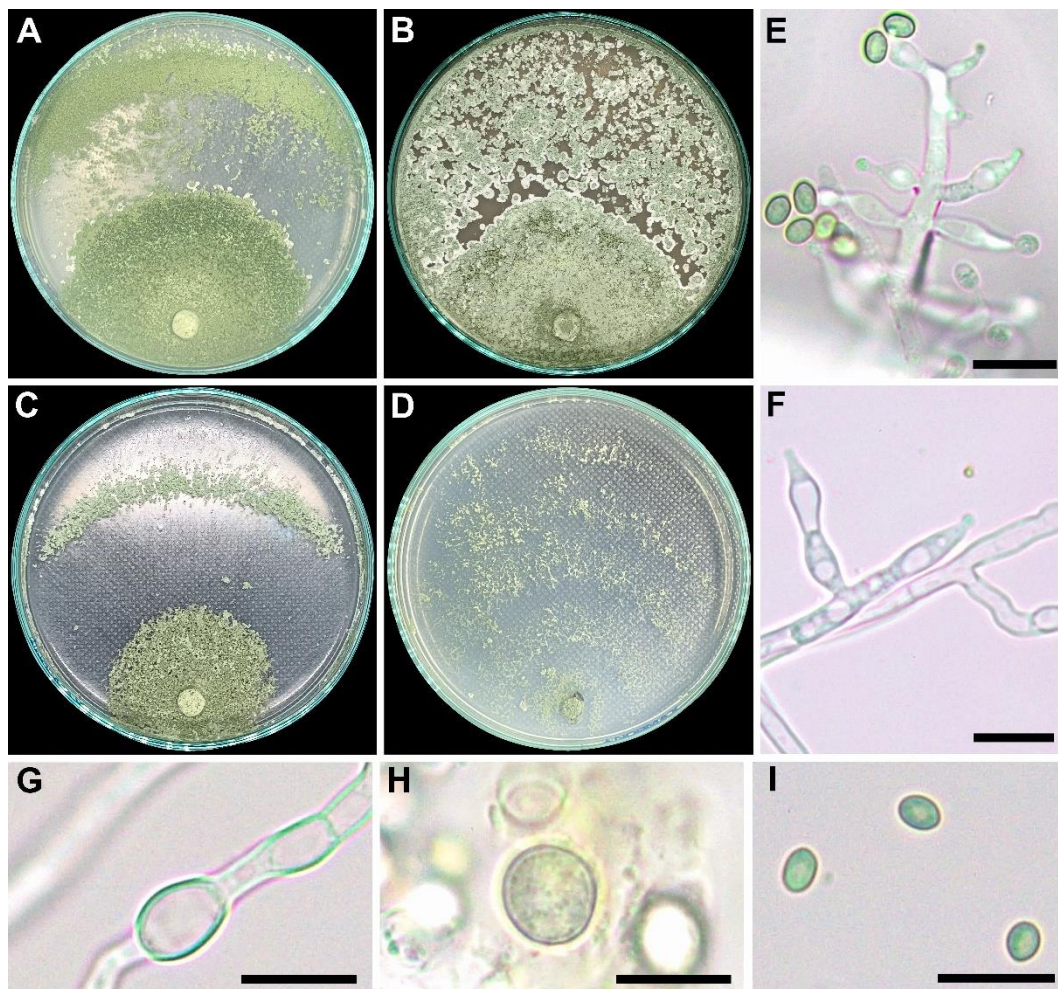
A 35 °C, *T. longibrachiatum* mantuvo un crecimiento robusto. En MEA, se registró un sobrecrecimiento ($96,65 \pm 2,60$ mm) alrededor de las 67,5 h, con un tiempo para cubrir la placa de ~3 días y una tasa de crecimiento de $35,55 \pm 1,20$ mm/día, observándose esporulación precoz, micelio aéreo reducido y reverso amarillo-ámbar. En PDA, se alcanzaron $87,45 \pm 1,66$ mm alrededor de las 72 h (3,5 días para cubrir la placa), con una tasa de $29,15 \pm 0,62$ mm/día, con menor zonación, esporulación uniforme de tono verde claro y reverso crema a amarillo pálido. En CMD, el crecimiento fue de $79,19 \pm 2,24$ mm en 72 h (4 días para cubrir la placa),

con una tasa de $26,53 \pm 0,78$ mm/día, destacando la esporulación leve, micelio hialino y reverso ámbar tenue. Finalmente, en SNA, se obtuvo $74,14 \pm 1,18$ mm en 72 h, llenando la placa en 4,5 días, con una tasa de $24,78 \pm 0,46$ mm/día, colonias irregulares y reverso sin pigmentación, con esporulación escasa y tardía.

Microscópicamente, *T. longibrachiatum* presenta conidios predominantemente elipsoidales a subglobosos, ocasionalmente oblongos, con dimensiones que oscilan entre (3,4-) $3,8 - 4,4$ (-4,8) μm de largo por (2,4-) $2,7 - 2,9$ (-3,2) μm de ancho. Estos conidios poseen una superficie lisa, pared delgada y son hialinos o de color verde pálido, aunque en masa se tornan verde intenso. Se disponen en cúmulos apicales (racimos) en las puntas de las fiálides. Las fiálides, de forma ampuliforme a lageniforme, miden (3,3-) $7,9 - 11,9$ (-14,2) μm de largo por (1,12-) $2,40 - 3,24$ (-3,99) μm de ancho en la base, y se organizan en verticilos a lo largo de conidióforos ramificados que confieren un patrón arbustivo. Estas estructuras pueden encontrarse aisladas o agrupadas densamente. Adicionalmente, se observan clamidosporas de forma globosa a subglobosa, aunque en ocasiones irregulares, con un tamaño que varía entre (4,32-) $8,29 - 10,03$ (-13,69) μm de largo por (4,13-) $7,25 - 8,76$ (-11,95) μm de ancho, de pared celular gruesa y lisa. Estas se forman de manera intercalar o terminal en las hifas, frecuentemente en cadenas cortas, y su coloración varía de hialina a ligeramente pigmentada.

Figura 8

Caracterización morfológica de Trichoderma longibrachiatum



Nota. Cultivos A–D de *T. longibrachiatum* en diferentes medios a 25 °C tras 7 días en oscuridad (A en PDA, B en MEA, C en CMD, D en SNA). Las estructuras anamorfás fueron observadas en medio PDA. E – F conidióforos y fiálides, G clamidospora intercalar, H clamidospora terminal, I conidias. Barras de escala: 10 μm (E – I).

4.1.3.3. *Trichoderma* sp. AZEN06 y TI15

Trichoderma sp. exhibió un crecimiento variable dependiendo de la temperatura y el medio de cultivo (Figura 9). En medios ricos, como MEA y PDA, mostró tasas de crecimiento elevadas a temperaturas óptimas (20 – 25 °C), colonizando placas de 100 mm en 5 días, mientras que, en medios pobres como SNA y CMD, el crecimiento fue moderado y la esporulación, tardía en SNA. A 30 °C, el crecimiento se inhibió drásticamente en todos los medios.

A 15 °C, el crecimiento de *Trichoderma* sp. es lento y varía según el medio. En MEA, la tasa de crecimiento es de $7,74 \pm 0,25$ mm/día, alcanzando un radio de $23,24 \pm 1,35$ mm a las 72 horas y cubriendo la placa en ~6,5 días. Las colonias son inicialmente blancas, con micelio algodonoso y zonación incipiente. En CMD, la tasa es de $7,60 \pm 0,43$ mm/día, con un radio de $22,85 \pm 2,13$ mm a las 72 horas y cubriendo la placa en 7 días; las colonias son hialinas, densas y con esporulación ausente. En PDA, la tasa es de $7,67 \pm 0,30$ mm/día, logrando un radio de $23,4 \pm 0,58$ mm a las 72 horas y cubriendo la placa en 7 días; aquí, las hifas aéreas son densas y el olor a coco es fuerte. En SNA, mostró un crecimiento más lento, con una tasa de $5,46 \pm 0,42$ mm/día, alcanzando $16,57 \pm 0,89$ mm a las 72 horas y cubriendo completamente la placa a los 10 días. Las colonias fueron translúcidas, con hifas dispuestas radialmente y esporulación presente, formando pústulas que cambiaban de un color blanquecino a verde limón conforme maduraban. No se observó pigmento difusor en ningún medio.

A 20 °C, el crecimiento se acelera notablemente. En MEA, la tasa es de $14,97 \pm 0,36$ mm/día, alcanzando $44,82 \pm 1,42$ mm a las 72 horas y cubriendo la placa en 4 días. Las colonias desarrollan micelio aéreo denso y nula esporulación. En CMD, con una tasa de $11,74 \pm 0,55$ mm/día, el crecimiento a las 72 horas es de $35,78 \pm 2,15$ mm, cubriendo la placa en 5 días; se observan hifas aéreas discretas y pústulas amorfas tras varios días. En PDA, la tasa es de $13,89 \pm 0,44$ mm/día, logrando un crecimiento de $41,72 \pm 2,41$ mm a las 72 horas y colonización completa en 4 días; aquí, el micelio forma una estera blanca aglutinada y el reverso adquiere un tono amarillento. En SNA, con $12,88 \pm 0,26$ mm/día, el crecimiento es de $38,68 \pm 1,24$ mm a las 72 horas, cubriendo la placa en 4,5 días; las colonias muestran poco micelio aéreo. El olor a coco se intensifica en PDA y MEA.

La temperatura óptima para el crecimiento rápido de *Trichoderma* sp. es de 25 °C. En MEA, la tasa de crecimiento es de $15,02 \pm 0,42$ mm/día, alcanzando $45,15 \pm 0,18$ mm a las 72 horas y cubriendo completamente la placa en 4 días. Las colonias presentan zonación concéntrica de coloración blanca, micelio aéreo denso y reverso de tonalidad amarillenta. En CMD, se observa un crecimiento de $45,98 \pm 1,67$ mm a las 72 horas ($11,99 \pm 0,70$ mm/día), con colonización total en 5 días; las colonias son densas, con esporulación tardía (a los 10 días), en forma de pústulas amorfas, y un fuerte olor a coco. En PDA, se registra un radio de 48,45 mm a las 72 horas ($14,95 \pm 0,64$ mm/día), alcanzando cobertura total en 5 días; las colonias presentan zonación concéntrica blanquecina, micelio aéreo denso y reverso

amarillento. En SNA, el crecimiento es de 35,69 mm a las 72 horas ($11,87 \pm 0,41$ mm/día), cubriendo la placa en 6 días; la superficie adquiere un aspecto veloso por la presencia de hifas aéreas largas, sin producción de pigmento. La esporulación se observa en SNA entre los 10 y 15 días.

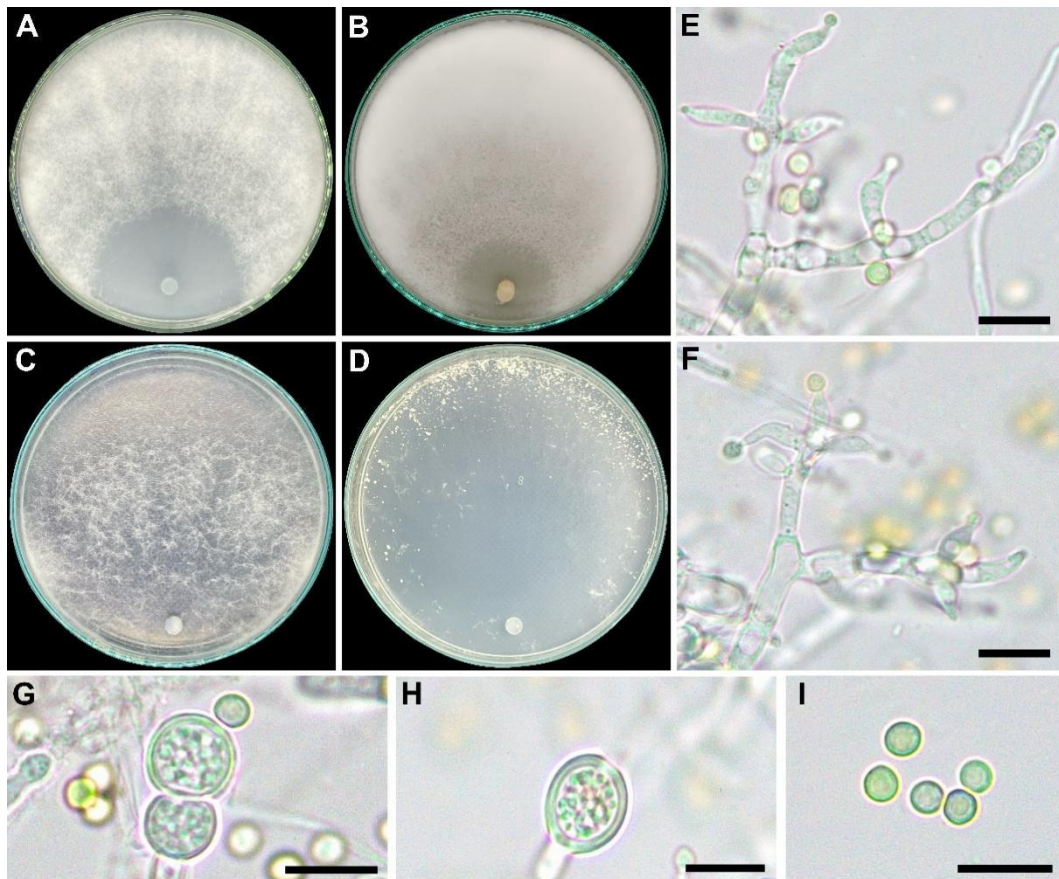
A 30 °C, el crecimiento se inhibe drásticamente. En CMD, el radio a las 72 horas es de $12,78 \pm 0,47$ mm, sin lograr cubrir la placa incluso tras varias semanas; las colonias son casi translúcidas. En PDA, el crecimiento es de $6,76 \pm 1,78$ mm a las 72 horas, con micelio blanco y denso, pero sin esporulación visible. En SNA, el crecimiento es mínimo ($6,45 \pm 2,47$ mm a las 72 horas), y las colonias carecen de estructuras reproductivas. No se observa pigmentación en ningún medio, y el olor a coco es imperceptible.

Microscópicamente, *Trichoderma* sp. presentan conidios que se desarrollan dentro de las pústulas, dando lugar a una coloración que varía de blanquecina a verde limón. Los conidióforos rara vez presentan un eje principal definido y suelen estar escasamente ramificados, típicamente de forma asimétrica y en ángulos estrechos. Las fiálides, solitarias o en verticilos de 2 a 3, son angostamente lageniformes, apenas o distintivamente hinchadas en o por debajo de la mitad, rectas o, con la edad, frecuentemente curvadas, y a menudo con base o cuello largo. Estas fiálides tienen medidas de (4,90-) 7,87 – 9,55 (-11,85) μm de largo y (1,95-) 2,58 – 2,92 (-3,29) μm de ancho en la base. Los conidios son globosos a subglobosos, menos comúnmente elipsoidales y raramente oblongos; suelen estar

ligeramente atenuados hacia un extremo, con dimensiones de (3,22-) 3,75 – 4,05 (-4,23) μm de largo por (3,28-) 3,43 – 3,55 (-3,66) μm de ancho, presentando un color verde y una superficie verrugosa. Las clamidosporas, comunes, aunque dispuestas libremente, se presentan en posición terminal e intercalar, con formas globosas a subglobosas o piriformes, y ocasionalmente oblongas, midiendo (7,05-) 9,85 – 11,50 (-12,45) μm de largo por (6,29-) 8,34 – 9,42 (-10,91) μm de ancho.

Figura 9

Caracterización morfológica de Trichoderma sp.



Nota. Cultivos A – D de *Trichoderma sp.* en diferentes medios a 25 °C tras 7 días en oscuridad (A en PDA, B en MEA, C en CMD, D en SNA). Las estructuras anamorfas fueron observadas únicamente en medio SNA. E – F conidióforos y fíalides, G clamidospora terminal, H clamidospora intercalar, I conidias. Barras de escala: 10 μm (E – I).

4.1.3.4. *Trichoderma paratroviride* MA02

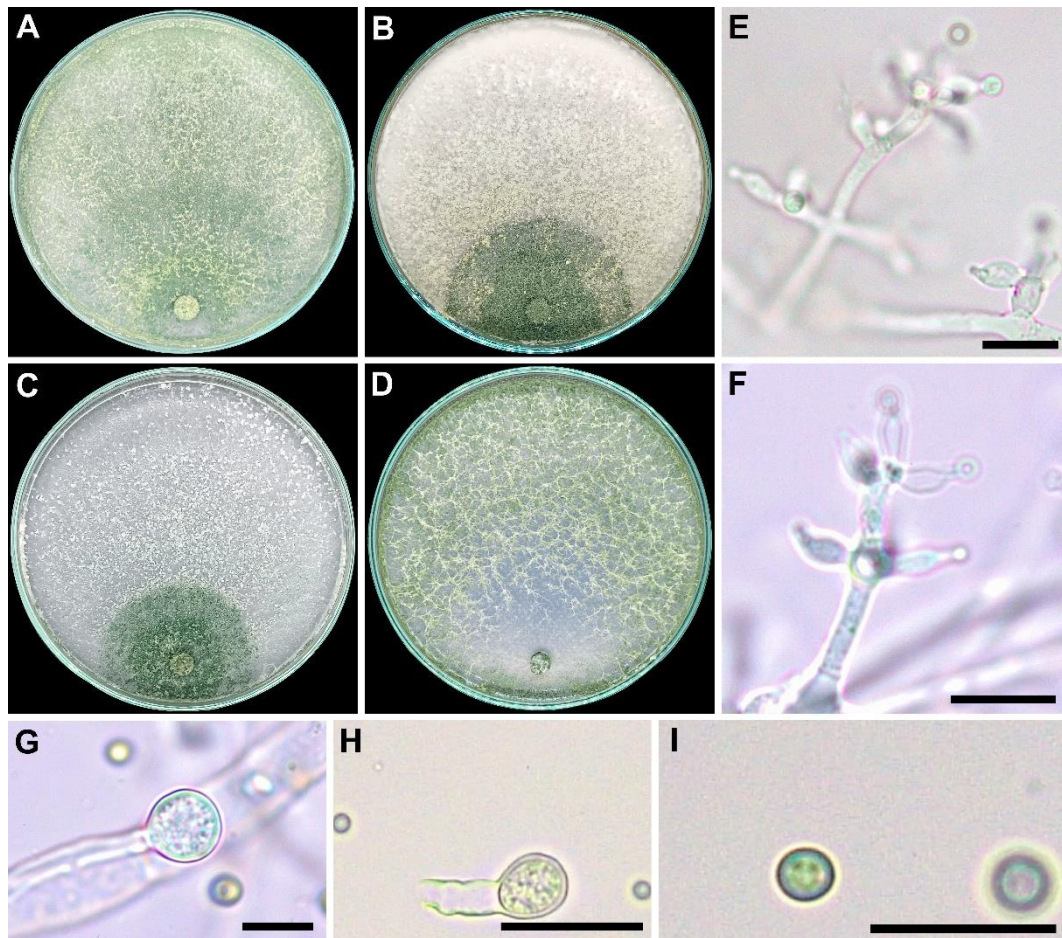
T. paratroviride mostró un crecimiento termodependiente y diferenciado según el medio de cultivo (Figura 10). A 20 °C, en MEA, presentó una tasa de crecimiento de $19,82 \pm 0,39$ mm/día, alcanzando un radio de $59,5 \pm 1,41$ mm a las 72 h, y colonizando la placa en 5 días. En PDA, la tasa fue de $19,70 \pm 0,38$ mm/día (radio de $59,13 \pm 0,31$ mm a las 72 h), cubriendo la placa en 5 días, con micelio denso y esporulación verde en zonas concéntricas. En CMD, el crecimiento fue de $17,93 \pm 3,75$ mm/día, logrando $55,74 \pm 1,23$ mm a las 72 h y colonización completa en 5 días, mientras que en SNA, la tasa fue de $15,49 \pm 0,77$ mm/día (radio de $46,51 \pm 1,12$ mm a las 72 h), requiriendo 6 días para cubrir la placa.

A 25 °C, se observó el máximo crecimiento; en PDA, la tasa fue de $23,72 \pm 1,11$ mm/día, alcanzando un radio de $75,2 \pm 0,15$ mm a las 72 h y colonizando la placa en 4 días, con micelio blanco-verdoso y reverso amarillento claro. En MEA, la tasa fue de $21,03 \pm 0,19$ mm/día (radio de $63,15 \pm 1,32$ mm a las 72 h), cubriendo la placa en 4 días, mientras que en CMD, con $18,24 \pm 0,21$ mm/día, se alcanzó $54,78 \pm 1,17$ mm a las 72 h y colonización en 5 días. En SNA, el crecimiento fue más lento ($14,44 \pm 0,52$ mm/día), con $43,38 \pm 1,39$ mm a las 72 h y 6 días para cubrir la placa, mostrando micelio aéreo con coloración verdosa y esporulación escasa.

A 30 °C, el crecimiento se inhibió significativamente; en PDA, la tasa fue de $9,90 \pm 0,33$ mm/día (radio de $29,7 \pm 1,02$ mm a las 72 h), sin cubrir la placa incluso tras 7 días. En MEA, la tasa fue de $9,30 \pm 0,48$ mm/día (radio de $27,9 \pm 0,18$

mm a las 72 h), y en CMD, de $9,50 \pm 0,30$ mm/día (radio de $28,5 \pm 1,21$ mm a las 72 h), ambas con micelio escaso y ausencia de esporulación visible. En SNA, el crecimiento fue mínimo ($8,69 \pm 0,33$ mm/día), con $26,1 \pm 0,11$ mm a las 72 h, sin superar el 50 % de la placa tras 7 días.

T. paratroviride presenta conidióforos altamente ramificados, de disposición arbustiva, con ramas primarias y secundarias organizadas en verticilos o pares, hialinas y de paredes lisas. Las fiálides, de forma ampuliforme a lageniforme, miden ($5,12-$) $7,38 - 8,62$ ($-10,32$) μm de largo por ($2,62-$) $3,22 - 3,63$ ($-4,50$) μm de ancho en la base, y se agrupan en racimos apicales. Estas producen conidios elipsoidales a subglobosos, con dimensiones de ($2,87-$) $3,22 - 3,41$ ($-3,51$) μm de largo por ($2,57-$) $2,91 - 3,07$ ($-3,29$) μm de ancho, lisos y hialinos, pero verde claro a oscuro en masa por la acumulación de esporas maduras. Las clamidosporas, escasas o ausentes, son globosas a subglobosas, con medidas de ($7,30-$) $8,34 - 9,08$ ($-10,10$) μm de largo por ($6,33-$) $7,68 - 8,52$ ($-9,70$) μm de ancho, de paredes gruesas, lisas o ligeramente verrucosas, y se ubican de forma intercalar o terminal en las hifas.

Figura 10*Caracterización morfológica de Trichoderma paratroviride*

Nota. Cultivos A–D de *T. paratroviride* en diferentes medios a 25 °C tras 7 días en oscuridad (A en PDA, B en MEA, C en CMD, D en SNA). Las estructuras anamorfas fueron observadas en medio PDA. E – F conidióforos y fiáldes, G – H clamidospora terminal, I conidias. Barras de escala: 10 μm (E – H).

4.1.3.5. *Trichoderma asperelloides* CA07

A 25 °C, el crecimiento de *T. asperelloides* varió según el medio de cultivo. En MEA presentó una tasa de crecimiento de $16,15 \pm 1,94$ mm/día, alcanzando un radio aproximado de $48,58 \pm 2,13$ mm a las 72 h y cubriendo la placa en 5 días. Las colonias mostraron un color verde pálido, con zonas blanquecinas algodonosas y más difusas que en PDA, una textura muy densa y esponjosa, y un aspecto pulverulento hacia el centro. El crecimiento fue abundante y más irregular, con un micelio aéreo fuertemente ramificado, mientras que el reverso presentó una tonalidad pardo clara. En PDA, la tasa fue de $16,25 \pm 0,54$ mm/día (radio de $48,89 \pm 1,07$ mm a 72 h), también completando la colonización en 5 días. Las colonias fueron algodonosas a vellosas, con un color verde intenso en la parte central y anillos concéntricos más claros hacia los bordes, mostrando zonas circulares bien definidas, y el reverso fue amarillento a incoloro, sin pigmentación difusa significativa. En CMD, la tasa fue de $12,91 \pm 0,39$ mm/día (radio de $38,78 \pm 0,55$ mm a 72 h), requiriendo 6 días para cubrir la placa. Las colonias mostraron zonas concéntricas alternadas entre verde oscuro y blanco, con textura compacta y algo granular, y un patrón zonado muy característico. El reverso fue generalmente incoloro o ligeramente amarillento. En SNA, la tasa fue de $13,61 \pm 0,50$ mm/día (radio de $40,84 \pm 1,13$ mm a 72 h), finalizando la colonización en 7 días. Las colonias fueron de crecimiento más laxo, con un color verde tenue y más pálido en general, y una textura plana. Se observaron estructuras dispersas en forma de

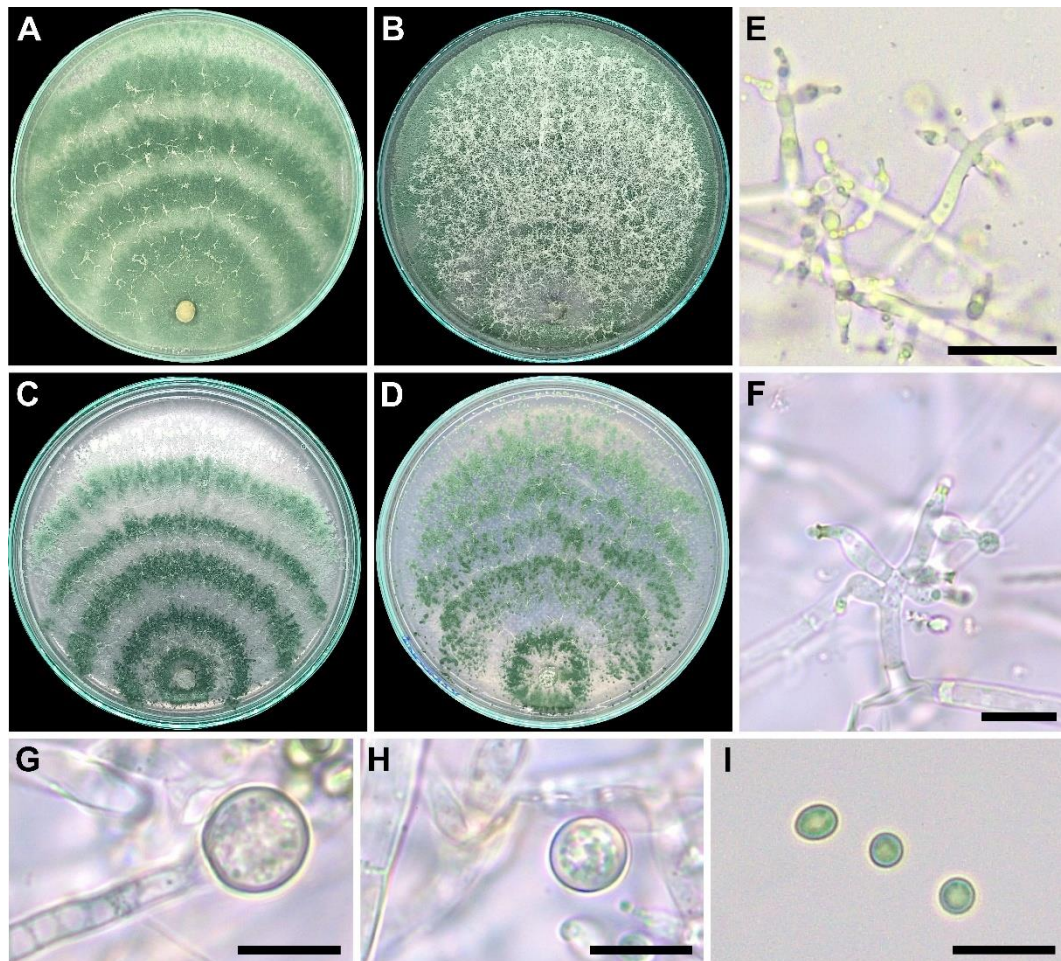
arbustos, patrón típico en medios pobres en nutrientes; el reverso fue incoloro a ligeramente grisáceo.

A 30 °C, el crecimiento fue más lento. En MEA, la tasa fue de $12,33 \pm 1,02$ mm/día (radio de $37,07 \pm 1,52$ mm a 72 h), cubriendo la placa en 7 días, con micelio denso y reverso pardo claro. En PDA, la tasa fue de $10,78 \pm 0,28$ mm/día (radio de $32,38 \pm 0,14$ mm a 72 h), cubriendo la placa en 7 días y mostrando un centro verde intenso con anillos concéntricos. En CMD, la tasa fue de $9,31 \pm 0,24$ mm/día (radio de $27,94 \pm 2,77$ mm a 72 h), con patrón zonado distintivo y cubriendo la placa en 7,5 días. En SNA, la tasa fue de $13,30 \pm 0,17$ mm/día (radio de $39,90 \pm 1,21$ mm a 72 h), completando la colonización en 7 días, con estructuras arborescentes dispersas.

A 35 °C, el crecimiento se redujo significativamente. En PDA, la tasa fue de $9,08 \pm 1,96$ mm/día (radio de $27,21 \pm 0,98$ mm a 72 h), cubriendo la placa en 8 días, con micelio escaso y verde claro. En MEA, la tasa fue de $6,99 \pm 3,82$ mm/día (radio de $21,05 \pm 1,14$ mm a 72 h), requiriendo 8,5 días para colonizar. En CMD, la tasa fue de $6,13 \pm 2,60$ mm/día (radio de $18,46 \pm 0,77$ mm a 72 h), sin evidencia de esporulación. Finalmente, en SNA, la tasa fue de $5,54 \pm 1,83$ mm/día (radio de $16,68 \pm 0,67$ mm a 72 h), con crecimiento mínimo incluso tras 10 días.

T. asperelloides presenta conidióforos altamente ramificados, de disposición arbustiva, con ramas primarias y secundarias, hialinas y organizadas en verticilos. Las fialides, ampuliformes a lageniformes, miden (5,42-) 7,70 – 9,75 (-13,17) μm

de largo por (2,56-) 3,58 – 4,07 (-4,59) μm de ancho en la base, y se agrupan en racimos apicales. Los conidios son elipsoidales a subglobosos, lisos y hialinos, con dimensiones de (3,43-) 3,74 – 3,92 (-4,18) μm de largo por (2,54-) 3,13 – 3,30 (-3,39) μm de ancho, adquiriendo en masa un tono verde oscuro. Las clamidosporas, escasas y principalmente formadas en condiciones de estrés, son globosas a subglobosas, con medidas de (5,94-) 8,75 – 10,67 (-13,91) μm de largo por (4,43-) 8,01 – 9,56 (-,10,91) μm de ancho; tienen paredes gruesas, lisas o levemente verrugosas, y se disponen de forma intercalar o terminal (Figura 11).

Figura 11*Caracterización morfológica de Trichoderma asperelloides*

Nota. Cultivos A – D de *T. asperelloides* en diferentes medios a 25 °C tras 7 días en oscuridad (A en PDA, B en MEA, C en CMD, D en SNA). Las estructuras anamorfas fueron observadas en medio PDA. E – F conidióforos y fiáldes, G – H clamidospora terminal, I conidias. Barras de escala: 10 μm (E – I).

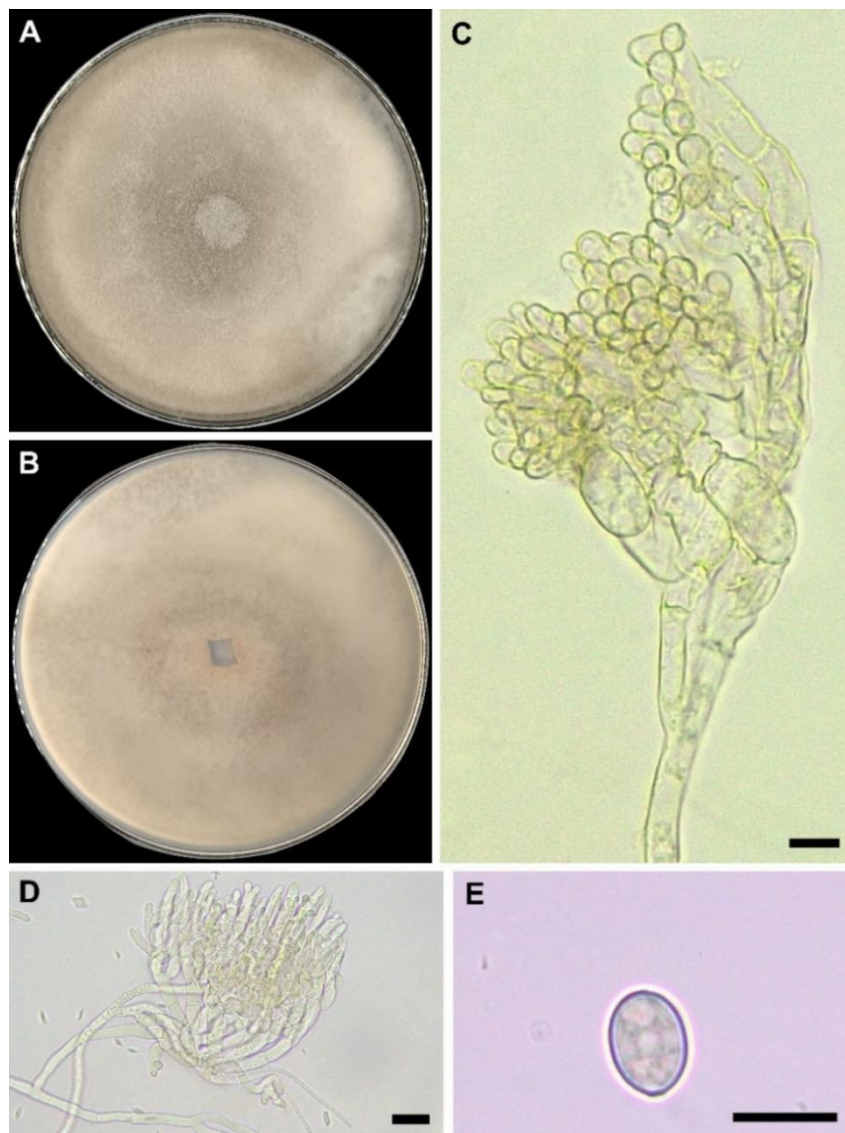
4.2. Aislamiento y caracterización de *Botrytis cinerea*

4.2.1. Aislamiento del patógeno

Se obtuvieron tres aislamientos de *B. cinerea*, codificados como BO01, BO02 y BO03, a partir de muestras de uva de mesa variedad Red Globe. De estos, se seleccionó el aislamiento BO01 para su caracterización y para evaluar el potencial biocontrolador de cepas de *Trichoderma* spp.

A nivel macroscópico, *B. cinerea* se manifiesta como un moho de aspecto algodonoso. Sus colonias presentan inicialmente una tonalidad blanquecina que evoluciona hacia grisácea o pardo claro a medida que maduran. En medio PDA, el micelio se expande de forma irregular, formando una masa aérea y esponjosa que cubre toda la placa en un período de cinco días (Figura 12).

Microscópicamente, este hongo presenta hifas hialinas, septadas y ramificadas. Los conidióforos, erguidos y de color marrón claro, emergen de las hifas y se dividen dicotómicamente en ápices dilatados. En estos extremos se forman racimos de conidios ovalados o elipsoidales, de superficie lisa y coloración que varía de hialina a grisácea. Las dimensiones de los conidios son de (5,5 -) 7,4 – 10,2 (- 11,8) μm de largo por (3,1 -) 4,5 – 5,4 (- 7,2) μm de ancho.

Figura 12*Caracterización morfológica de Botrytis cinerea*

Nota. Cultivo A – B de *B. cinerea* en medio PDA a 25 °C tras 10 días en oscuridad (A anverso, B reverso). C – D conidióforos en medio PDA y SNA, respectivamente. E conidia en PDA. Barras de escala: 10 μm (C – E).

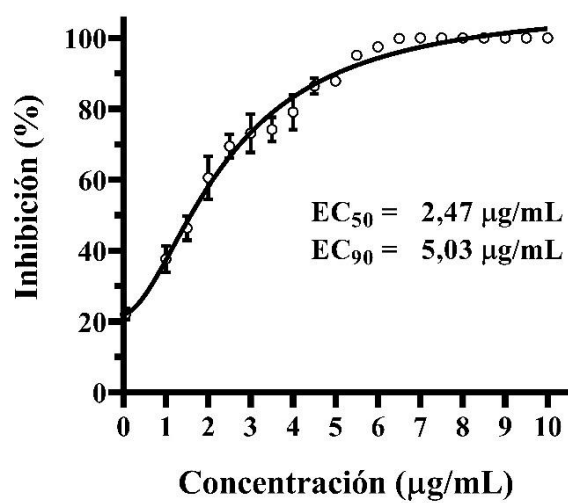
Los datos obtenidos del ensayo de sensibilidad de *B. cinerea* BO01 frente al fungicida tebuconazol muestran una clara relación dosis-respuesta, lo que evidencia la eficacia del compuesto. Los valores calculados de EC₅₀ (2,47 µg/mL) y EC₉₀ (5,03 µg/mL) reflejan que el fungicida posee una alta potencia, ya que es capaz de inhibir el 50 % del crecimiento micelial a una concentración relativamente baja.

El margen de acción observado entre la EC₅₀ y la EC₉₀ también es relevante, ya que, aunque se logra una inhibición considerable a bajas concentraciones, se requiere duplicar la dosis para alcanzar una inhibición del 90 %. La curva dosis-respuesta obtenida presenta un perfil sigmoide típico, con una inhibición progresiva del crecimiento fúngico que alcanza el 100 % a concentraciones cercanas a 10 µg/mL (Figura 13).

Por ello, se ha determinado utilizar una concentración de 6 µg/mL en los ensayos *in vivo* sobre bayas de uva de mesa y pruebas de germinación. Esta dosis se encuentra ligeramente por encima del valor de EC₉₀, lo que garantiza una inhibición efectiva del crecimiento fúngico sin exceder innecesariamente la cantidad de compuesto utilizado.

Figura 13

Curva de inhibición dosis-respuesta de *Botrytis cinerea* frente al fungicida tebuconazol, con valores de EC_{50} e EC_{90} .



Nota. La curva de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* frente al fungicida tebuconazol fue ajustada mediante un modelo de regresión no lineal de cuatro parámetros, mostrando un excelente ajuste ($R^2 = 0,9799$).

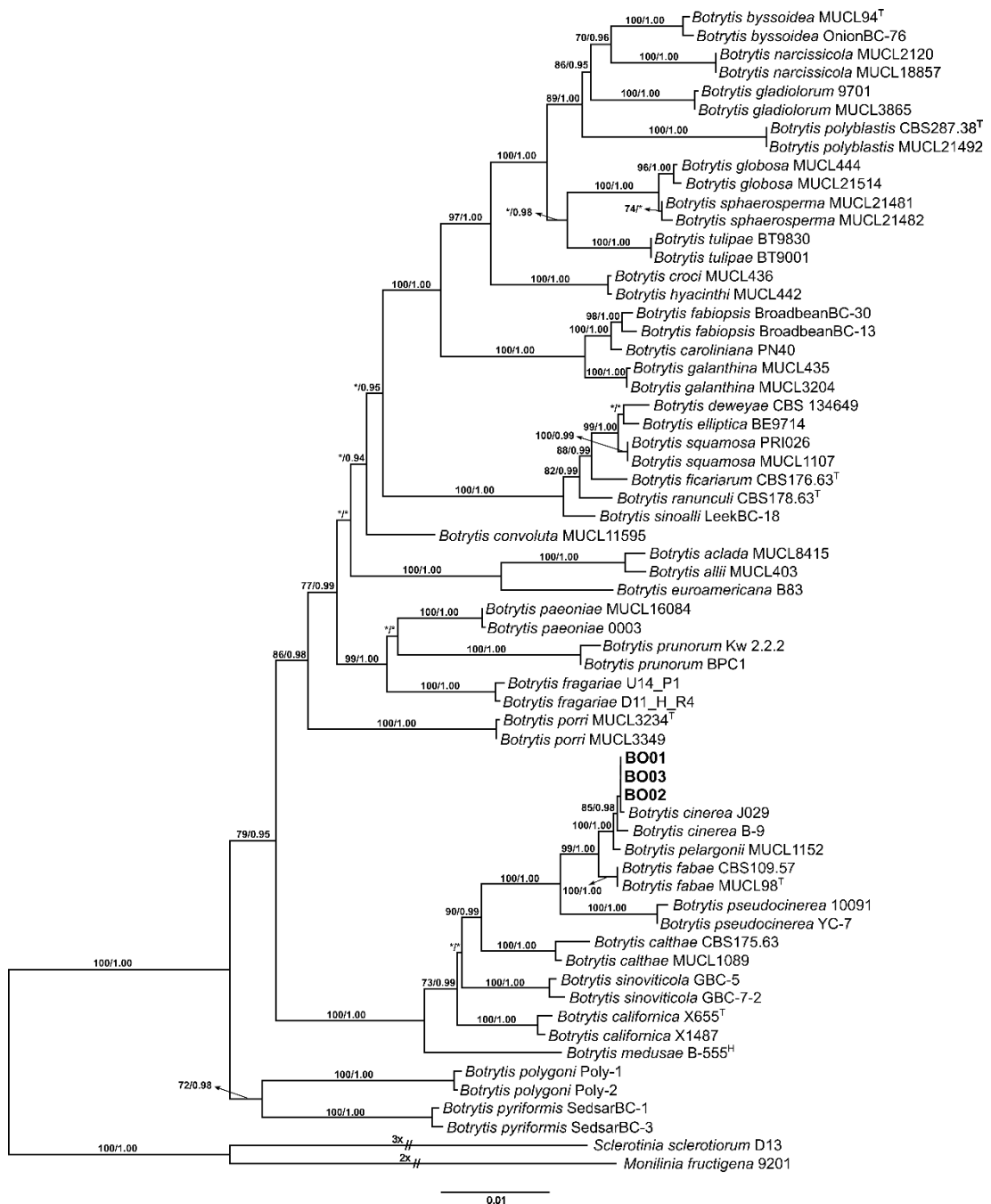
4.2.2. Identificación molecular y análisis filogenético

Se realizó el análisis filogenético con las secuencias obtenidas de un total de 63 aislamientos, agrupados en 38 taxones. *Monilinia fructigena* 9201 y *Sclerotinia sclerotiorum* D13 se emplearon como grupo externo. Tras la edición manual de los alineamientos individuales, el tamaño de la matriz concatenada fue de 2930 caracteres (872 para *g3pdh*, 966 para *hsp60* y 1092 para *rpb2*). El análisis en IQ-Tree generó un árbol filogenético con la mejor puntuación, con un valor de ML optimizado de -12756,6112. El modelo de sustitución calculado en jModelTest2 fue GTR+I+G, con una proporción de sitios invariantes (-i) = 0,4720 y un parámetro de forma de la distribución gamma (-a) de 0,8580. Luego, IQ-Tree optimizó el modelo a GTR+F+I+G4. Las frecuencias de bases fueron: A = 0,2720, C = 0,2366, G = 0,2369 y T = 0,2545 y tasas de sustitución: AC = 1,1558, AG = 3,9248, AT = 1,0887, CG = 0,5718, CT = 9,9856 y GT = 1,0000. El análisis de BI se ejecutó mediante un análisis particionado por loci. Para *g3pdh*, se aplicó el modelo TrNef+I+G (-i = 0,5110 y -a = 0,7620), y tasas de sustitución: AC = 1,0000, AG = 2,5990, AT = 1,0000, CG = 1,0000, CT = 10,5355 y GT = 1,0000. Para *hsp60*, se aplicó el modelo TIM2+I+G (-i = 0,4280 y -a = 0,7230), con frecuencias de bases: A = 0,2775, C = 0,2340, G = 0,2307 y T = 0,2579, y tasas de sustitución: AC = 1,5654, AG = 6,2273, AT = 1,5654, CG = 1,0000, CT = 13,1842 y GT = 1,0000. Para *rpb2*, se aplicó el modelo GTR+I+G (-i = 0,5340 y -a = 2,1700), con frecuencias de bases: A = 0,2799, C = 0,2134, G = 0,2382 y T = 0,2685, y tasas de

sustitución: AC = 1,6294, AG = 4,7339, AT = 0,9705, CG = 0,3872, CT = 10,7949 y GT = 1,0000. El árbol filogenético resultante de ML mostró una topología congruente con la obtenida en el análisis de BI, donde los aislados BO01, BO02 y BO03 se agruparon estrechamente con aislamientos de *Botrytis cinerea*, con un soporte estadístico de MLBP/BIPP = 85/0,98, respaldando la asignación con esta especie (Figura 14).

Figura 14

Árbol filogenético inferido por análisis de máxima verosimilitud a partir de secuencias concatenadas de *g3pdh*, *hsp60* y *rpb2*.



Nota. Árbol filogenético generado mediante el análisis máxima verosimilitud, utilizando las secuencias concatenadas de los loci *g3pdh*, *hsp60* y *rpb2* del género *Botrytis*. Los valores de Porcentaje de Soporte Bootstrap de Máxima Verosimilitud (MLBP) ≥ 70 % (izquierda) y los valores de Probabilidad Posterior de Inferencia Bayesiana (BIPP) $\geq 0,90$ (derecha) se indican en los nodos. *Sclerotinia sclerotiorum* D13 y *Monilinia fructigena* 9201 se seleccionaron como grupo externo. * Indica valores de ML < 70 % y valores de BI $< 0,90$. La letra ^T indica cultivo tipo. La letra ^H indica cultivo holotipo.

4.3. Evaluación del potencial biocontrolador de *Trichoderma* spp.

4.3.1. Pruebas de antagonismo directo

4.3.1.1. Prueba de antibiosis

La evaluación de la actividad de antibiosis de *Trichoderma* spp. frente a *B. cinerea* BO01 se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) (Anexo 1) y la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). El análisis reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, reflejando variabilidad en la eficacia inhibitoria (Tabla 6) (Figura 17A).

Las cepas clasificadas en el grupo A, *T. longibrachiatum* AZEN14 ($88,45 \pm 4,97$ %), *T. afroharzianum* AZEN20 ($88,25 \pm 0,81$ %), *T. longibrachiatum* AZEN17 ($87,99 \pm 2,45$ %) y *T. afroharzianum* AZEN10 ($87,63 \pm 2,45$ %), presentaron la mayor inhibición del crecimiento de *B. cinerea*, sin diferencias estadísticas entre

ellas. En el grupo AB se ubicaron *T. asperelloides* CA07 ($80,95 \pm 1,36$ %), *T. paratroviride* MA02 ($79,75 \pm 5,10$ %) y *Trichoderma* sp. AZEN06 ($79,06 \pm 2,63$ %), cuyas eficacias no difieren significativamente del grupo A ni del grupo B. En los grupos con menor eficacia, grupo B: *T. longibrachiatum* PA06 ($77,80 \pm 1,23$ %), grupo BC: *Trichoderma* sp. TI15 ($72,49 \pm 4,30$ %) y grupo C: *T. longibrachiatum* CA01 ($66,22 \pm 4,25$ %), se observa una inhibición significativamente menor, especialmente en CA01, el aislamiento menos eficaz. En conjunto, estos resultados refuerzan la dominancia de las cepas AZEN20, AZEN10, AZEN14 y AZEN17 (grupo A), cuyas especies (*T. afroharzianum* y *T. longibrachiatum*) presentan un alto potencial antibiótico frente a *B. cinerea*. (Figura 15).

Tabla 6

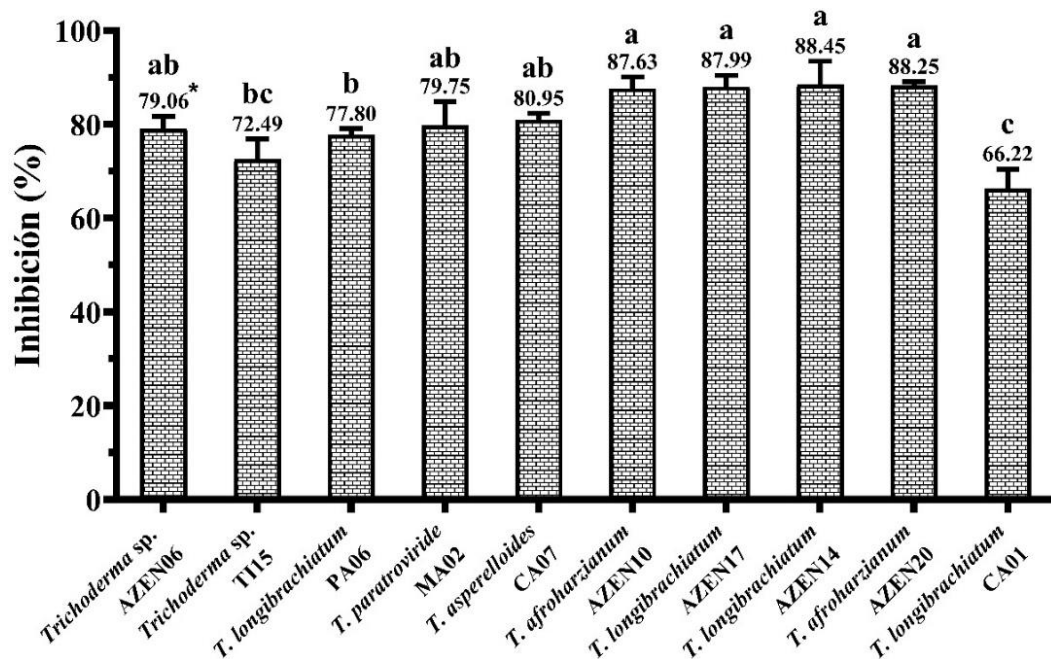
Porcentaje de inhibición del crecimiento de Botrytis cinerea BO01 por cepas de Trichoderma en ensayo de antibiosis

Especie	Código	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	AZEN14	88,45	4,97	A
<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	88,25	0,81	A
<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	87,99	2,45	A
<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	87,63	2,45	A
<i>T. asperelloides</i>	CA07	80,95	1,36	AB
<i>T. paratroviride</i>	MA02	79,75	5,10	AB
<i>Trichoderma sp</i>	AZEN06	79,06	2,63	AB
<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	77,80	1,23	B
<i>Trichoderma sp</i>	TI15	72,49	4,30	BC
<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	66,22	4,25	C

Nota. Los datos representan los valores medios y la desviación estándar de la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* BO01 en pruebas de antibiosis por cepas de *Trichoderma*. Las agrupaciones con letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Las medias que no comparten una misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

Figura 15

Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* BO01 por cepas de *Trichoderma* en ensayo de antibiosis



Nota. (*) Los datos representan el porcentaje de inhibición de 10 cepas de *Trichoderma*, evaluadas mediante ensayo de antibiosis. El ANOVA reveló diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), y la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) confirmó los contrastes entre cepas. Las letras sobre las barras indican grupos estadísticamente diferentes; las medias que no comparten una misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$). Las barras de error en la figura representan la desviación estándar.

4.3.1.2. Prueba de micoparasitismo

La evaluación de la capacidad de micoparasitismo de *Trichoderma* spp. frente a *B. cinerea* BO01 se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) (Anexo 2) y la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). El análisis evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, reflejando variabilidad en la eficacia de micoparasitismo (Tabla 7) (Figura 17B).

Las cepas de *T. afroharzianum* AZEN10 y AZEN20, *T. asperelloides* CA07 y *T. paratroviride* MA02, todas clasificadas en el grupo A, mostraron una eficacia del 100 % con desviación estándar nula, lo que indica un micoparasitismo completo y altamente consistente. En el grupo AB, *Trichoderma* sp. AZEN06 ($65,00 \pm 18,71$ %) presentó una eficacia significativamente menor, con alta variabilidad. Por otro lado, los aislamientos del grupo BC, como *T. longibrachiatum* CA01 ($35,00 \pm 28,28$ %) y *Trichoderma* sp. TI15 ($31,67 \pm 13,74$ %), junto con las del grupo C *T. longibrachiatum* AZEN17, PA06 y AZEN14 ($16,67 - 28,33$ %), exhibieron bajas eficacias y alta variabilidad, lo que indica una limitada capacidad micoparasítica bajo las condiciones evaluadas. En particular, *T. longibrachiatum* AZEN14 (grupo C) mostró la menor eficacia (16,67 %) y la mayor desviación estándar (DE = 23,57), lo que podría asociarse con deficiencias en la colonización del patógeno (Figura 16).

Tabla 7

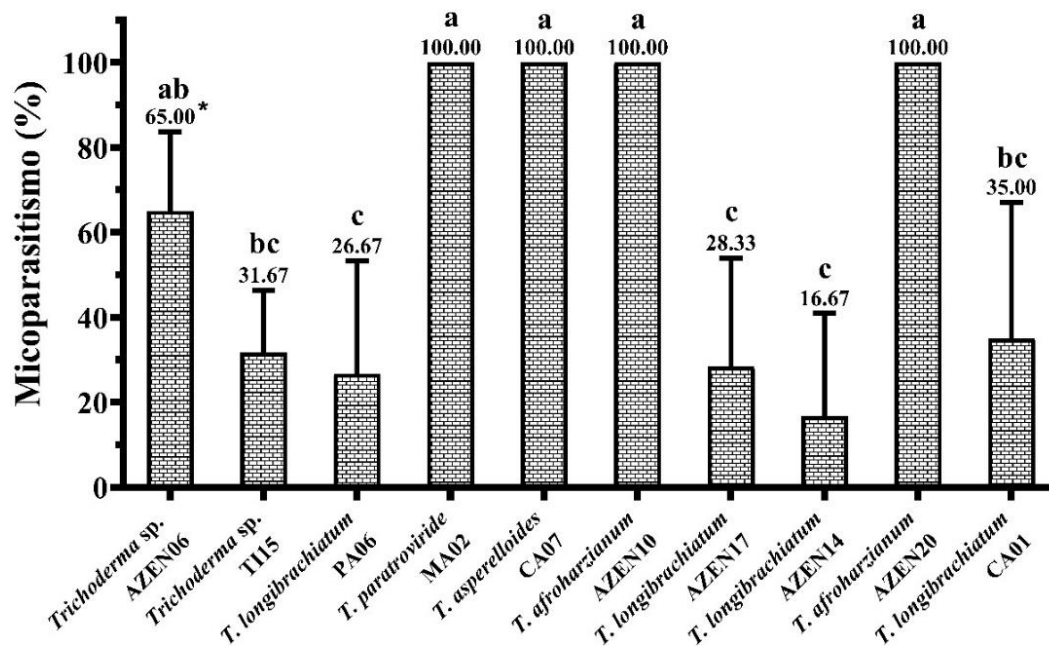
Porcentaje de micoparasitismo de Trichoderma frente a Botrytis cinerea BO01

Especie	Código	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
<i>Trichoderma afroharzianum</i>	AZEN10	100,00	0,00	A
<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	100,00	0,00	A
<i>T. asperelloides</i>	CA07	100,00	0,00	A
<i>T. paratroviride</i>	MA02	100,00	0,00	A
<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	65,00	18,71	AB
<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	35,00	28,28	BC
<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	31,67	13,74	BC
<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	28,33	24,50	C
<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	26,67	24,94	C
<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	16,67	23,57	C

Nota. La tabla muestra la media del porcentaje de micoparasitismo y su desviación estándar para cada cepa de *Trichoderma*. Las letras en la columna de agrupación representan grupos estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0.05$); medias que no comparten letras son significativamente distintas.

Figura 16

Porcentaje de micoparasitismo de *Trichoderma* frente a *Botrytis cinerea* BO01



Nota. (*) Los datos representan el porcentaje de micoparasitismo de 10 cepas de *Trichoderma*, evaluadas frente a *B. cinerea* BO01. El ANOVA reveló diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), y la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) confirmó los contrastes entre los aislados. Las letras sobre las barras indican grupos estadísticamente diferentes; las medias con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras de error en la figura representan la desviación estándar.

Figura 17

Actividad antagonista de cepas de Trichoderma spp. frente a Botrytis cinerea BO01 mediante ensayos de antibiosis y micoparasitismo

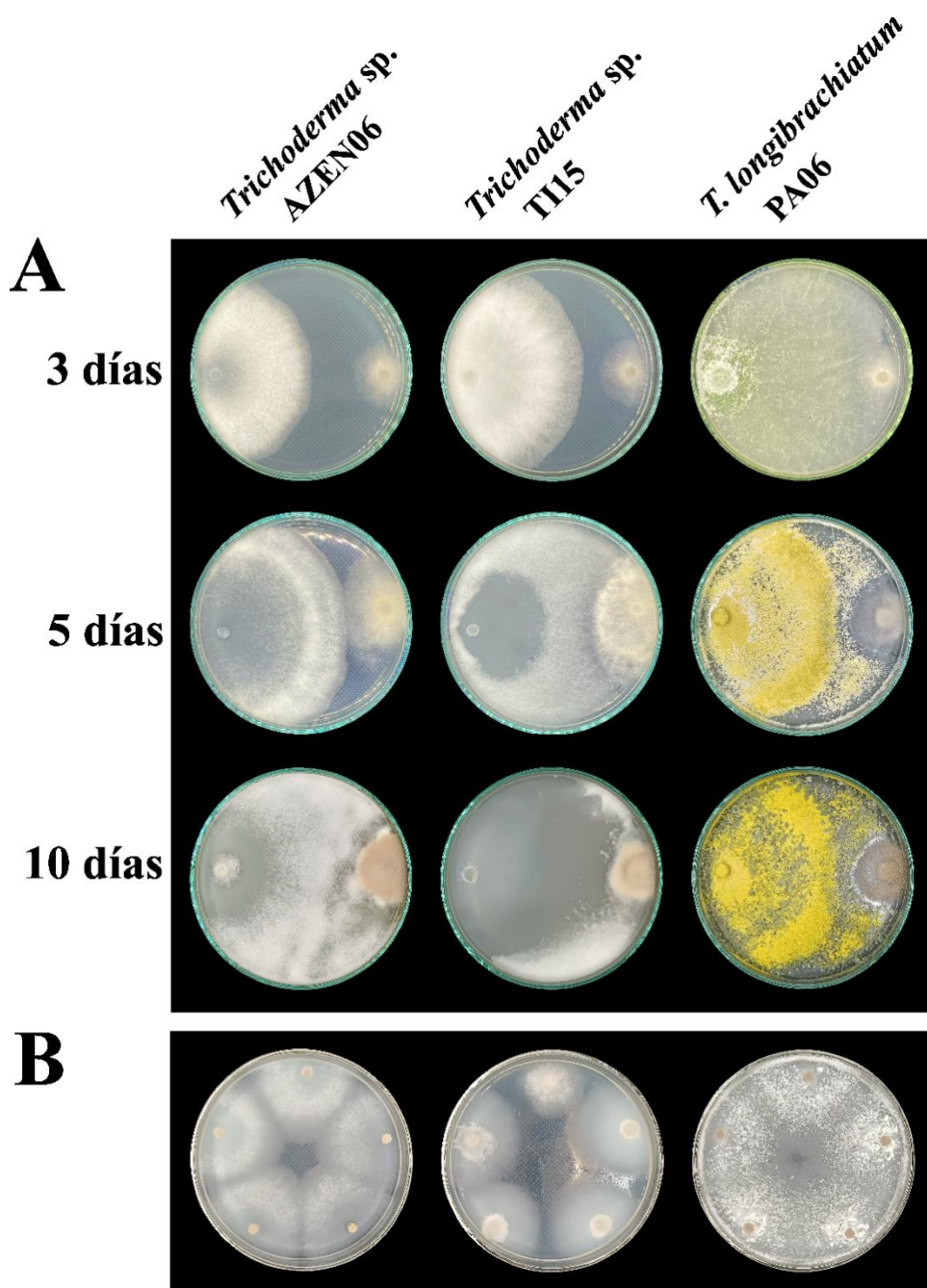


Figura 17 (continuación)

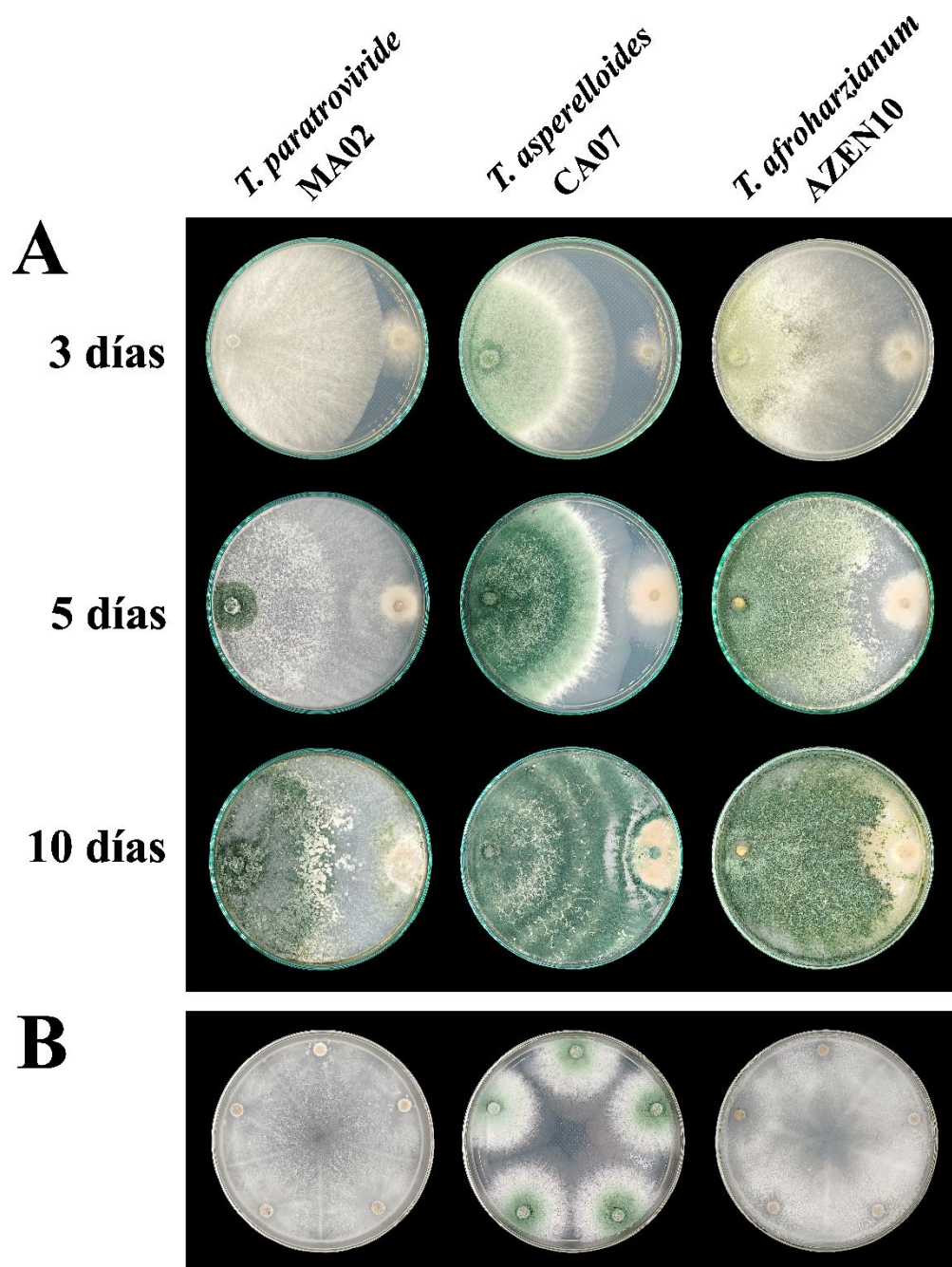


Figura 17 (continuación)

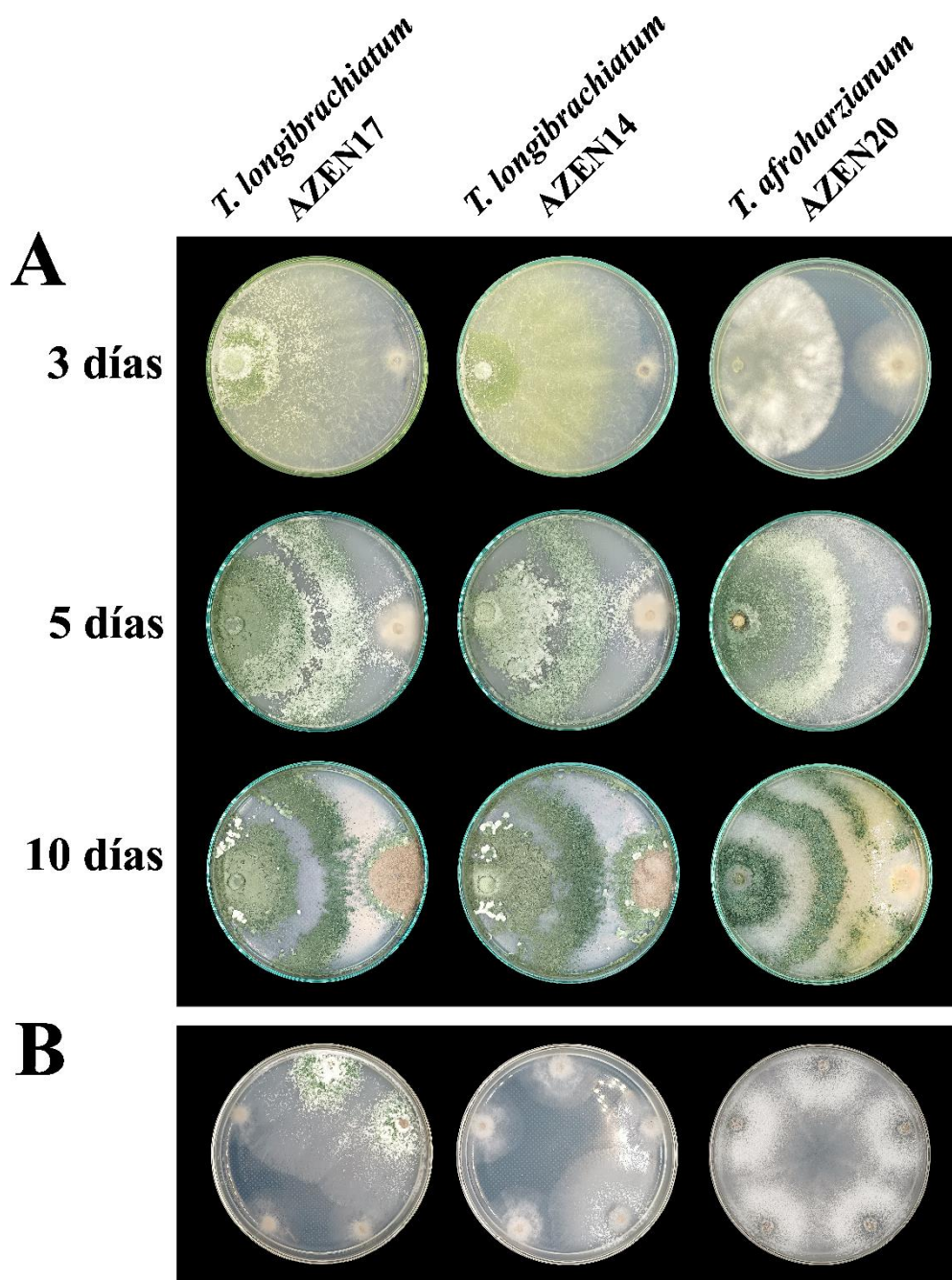
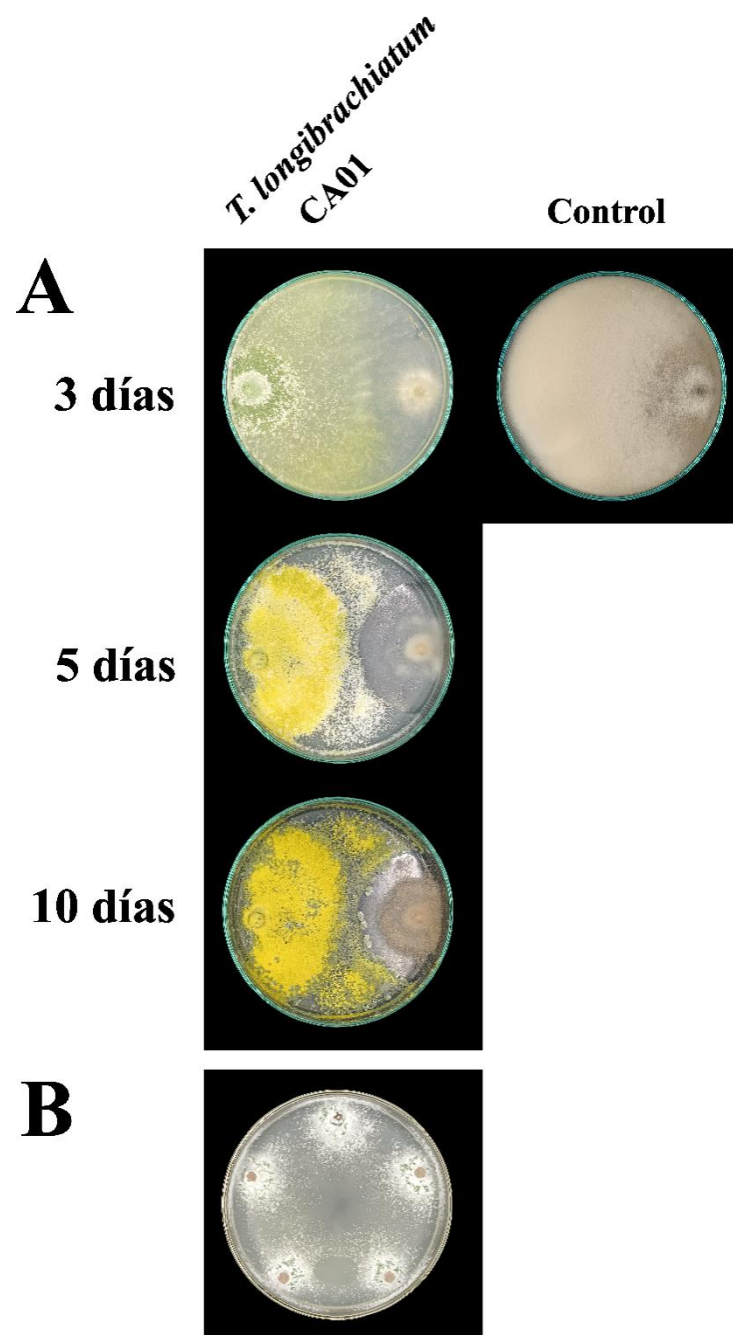


Figura 17 (continuación)



Nota. A. Muestra la inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* BO01 por cepas de *Trichoderma* spp. durante 3, 5 y 10 días de confrontación dual (ensayo de antibiosis). B. Corresponde al ensayo de micoparasitismo, donde se presentan discos tomados de placas previamente colonizadas por *Trichoderma* durante 15 días sobre *B. cinerea*, evidenciando el sobrecrecimiento micelial del agente antagonista.

4.3.2. Antagonismo potencial

Los resultados del antagonismo potencial de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *B. cinerea* BO01, analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) (Anexo 3) y prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$), revelan diferencias significativas en la eficacia antifúngica entre cepas ($p < 0,05$) (Tabla 8). Las más destacadas, pertenecientes al grupo A, fueron *T. afroharzianum* AZEN20 ($94,13 \pm 0,41$ %), *T. afroharzianum* AZEN10 ($93,82 \pm 1,23$ %) y *T. asperelloides* CA07 ($90,48 \pm 0,68$ %), todas con inhibiciones ≥ 90 % y sin diferencias estadísticas entre sí, lo que evidencia un alto y consistente potencial biocontrolador, especialmente en el caso de AZEN20. La cepa *T. paratroviride* MA02 ($89,88 \pm 2,54$ %) se ubica en un grupo intermedio AB, sin diferenciarse estadísticamente de las del grupo A ni de las del grupo BC, lo que la posiciona como una candidata secundaria de interés. En contraste, *Trichoderma* sp. AZEN06 ($72,03 \pm 5,31$ %), situada en el Grupo BC, mostró una eficacia moderadamente menor, con cierta variabilidad en su efecto. Las cepas menos efectivas, agrupadas en los grupos CD y D, incluyen *Trichoderma*

longibrachiatum AZEN17 ($58,16 \pm 9,02$ %), *T. longibrachiatum* AZEN14, *T. longibrachiatum* PA06, *Trichoderma* sp. TI15 y *T. longibrachiatum* CA01 (50,61 – 52,56 %), mostrando inhibiciones significativamente inferiores y, en el caso de CA01, una alta variabilidad (DE = 12,18 %) (Figura 18).

Tabla 8

Antagonismo potencial de cepas de Trichoderma frente a Botrytis cinerea BO01

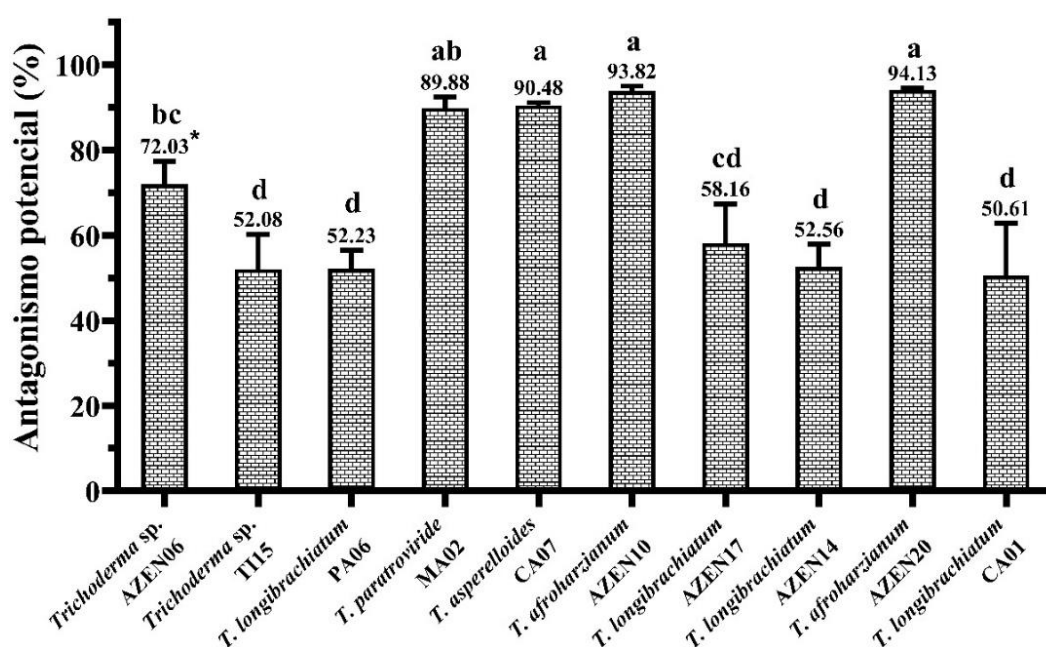
Especie	Código	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
<i>Trichoderma afroharzianum</i>	AZEN20	94,13	0,41	A
<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	93,82	1,23	A
<i>T. asperelloides</i>	CA07	90,48	0,68	A
<i>T. paratroviride</i>	MA02	89,88	2,54	AB
<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	72,03	5,31	BC
<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	58,16	9,02	CD
<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	52,56	5,33	D
<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	52,23	4,08	D
<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	52,08	8,28	D
<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	50,61	12,18	D

Nota. La tabla muestra la media del porcentaje de antagonismo potencial y la desviación estándar de cada cepa de *Trichoderma* frente a *B. cinerea* BO01. Las letras en la columna de agrupación representan grupos estadísticamente diferentes

según la prueba de Tukey ($p < 0.05$); medias que no comparten letras son significativamente distintas.

Figura 18

Antagonismo potencial de cepas de Trichoderma frente a Botrytis cinerea BO01



Nota. (*) Los datos representan el porcentaje de antagonismo potencial (PA) de 10 cepas de *Trichoderma* evaluadas frente a *B. cinerea* BO01. El ANOVA reveló diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), y la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$) confirmó los contrastes entre cepas. Las letras sobre las barras indican grupos estadísticamente diferentes; las medias que no comparten una misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$). Las barras de error en la figura representan la desviación estándar (DE).

4.3.3. Efecto de metabolitos volátiles (MVs)

4.3.3.1. Efecto inhibitorio *in vitro* de los MVs de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea*

Los resultados del efecto inhibitorio *in vitro* de los metabolitos volátiles (MVs) producidos por diferentes cepas de *Trichoderma* spp. frente a *B. cinerea* BO01, utilizando el método de placa invertida (Figura 21A), reveló diferencias significativas en la eficacia antifúngica de las cepas evaluadas. Mediante Un análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0,05$) (Anexo 4) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$), se identificaron distintos grupos de eficacia estadísticamente significativos, lo cual permitió discriminar el potencial inhibitorio de cada cepa (Tabla 9).

La cepa *Trichoderma* sp. AZEN06 se destacó con la inhibición más alta ($97,01 \pm 3,31$ %), clasificándose dentro del grupo A. Esta posición indica una diferencia significativa con respecto al resto de cepas y sugiere una capacidad inhibitoria casi total, altamente consistente. Le sigue *Trichoderma* sp. TI15 ($95,23 \pm 5,35$ %), clasificada en el grupo AB. Aunque no muestra diferencias estadísticas significativas con AZEN06 (grupo A), su inclusión en AB implica que comparte similitud tanto con la cepa más potente como con cepas de menor eficacia. Sin embargo, su media elevada lo posiciona como un candidato prometedor.

Por otro lado, *T. longibrachiatum* AZEN14 mostró la menor inhibición ($78,52 \pm 6,04$ %), clasificándose en el grupo B. Esta diferencia es estadísticamente significativa frente a AZEN06, aunque no frente a las cepas del grupo AB. Esto sugiere que su potencial inhibitorio es limitado en comparación con las cepas más eficaces, aunque estadísticamente comparable a la mayoría. Las demás cepas, pertenecientes al grupo AB, presentaron niveles de inhibición que oscilan entre el 79,45 % y 85,91 %, sin diferencias significativas entre sí ni con los extremos de los grupos A o B. Dentro de este grupo, destaca *T. longibrachiatum* AZEN17 ($85,91 \pm 3,07$ %) por su alta eficacia, mientras que *T. afroharzianum* AZEN10 ($80,86 \pm 16,04$ %) mostró una desviación estándar considerable (Figura 19).

Tabla 9

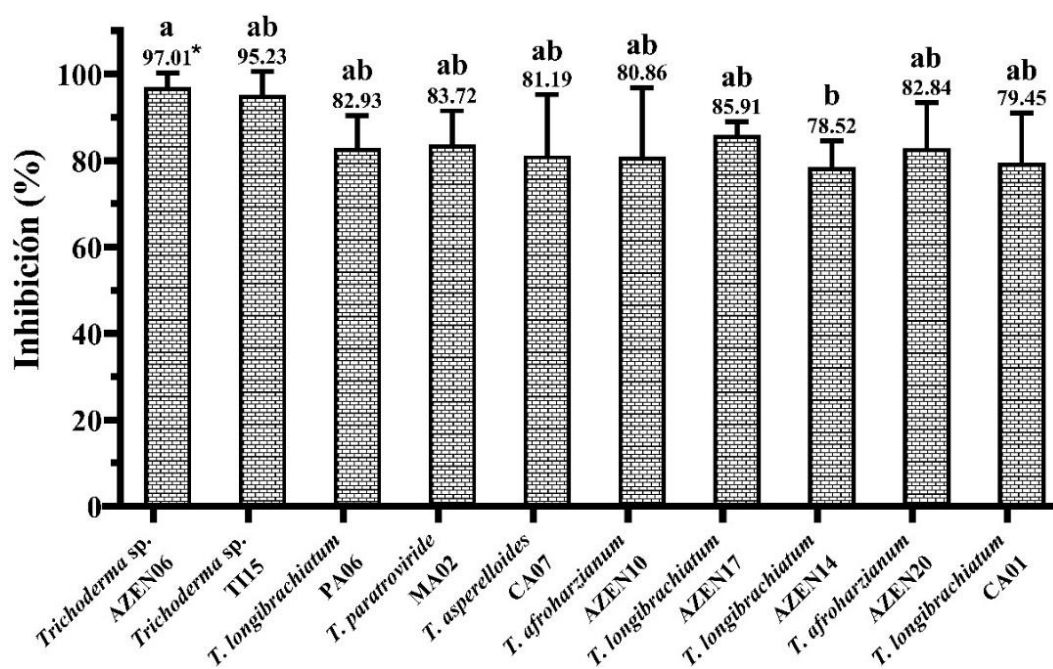
Efecto inhibitorio in vitro de los MVs de cepas de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea BO01

Especie	Código	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	97,01	3,31	A
<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	95,23	5,35	AB
<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	85,91	3,07	AB
<i>T. paratroviride</i>	MA02	83,72	7,77	AB
<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	82,93	7,45	AB
<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	82,84	10,54	AB
<i>T. asperelloides</i>	CA07	81,19	14,10	AB
<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	80,86	16,04	AB
<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	79,45	11,54	AB
<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	78,52	6,04	B

Nota. Las medias se agruparon mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Las letras indican diferencias significativas, las medias que no comparten una letra son estadísticamente diferentes entre sí. La inhibición se evaluó *in vitro* utilizando el método de placa invertida.

Figura 19

Efecto inhibitorio in vitro de los MVs de cepas de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea BO01



Nota. (*) Los datos representan el porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* por efecto de metabolitos volátiles (MV) producidos por 10 cepas de *Trichoderma* spp. El ANOVA reveló diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), y la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$) permitió identificar contrastes entre cepas. Las letras sobre las barras indican grupos estadísticamente diferentes; las medias que no comparten una misma letra difieren significativamente entre sí ($p < 0,05$). Las barras de error representan la desviación estándar (DE) de las medias.

4.3.3.2. Efecto inhibitorio *in vivo* de los MVs de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea*

Los resultados del análisis del efecto inhibitorio *in vivo* de los metabolitos volátiles (MV) producidos por cepas de *Trichoderma* spp. sobre *B. cinerea* BO01 en bayas de uva infectadas, evaluados mediante cámaras de microfumigación (Figura 21B), revelaron diferencias significativas en la eficacia antifúngica de las cepas evaluadas. El análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0,05$) (Anexo 5), junto con la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$), permitió identificar diferencias significativas entre las cepas (Tabla 10).

Las cepas *Trichoderma* sp. AZEN06 ($75,43 \pm 4,26$ %) y *Trichoderma* sp. TI15 ($74,30 \pm 7,08$ %) se ubicaron en el grupo A, destacándose por su alta capacidad inhibitoria *in vivo*. Aunque sus porcentajes de inhibición fueron inferiores a los observados en condiciones *in vitro* (97,01 % para AZEN06), su efectividad relativa en un entorno biológico más complejo resalta su potencial práctico. El resto de las cepas analizadas pertenecen al grupo B, con valores de inhibición significativamente menores (44,55 % a 49,80 %) y sin diferencias estadísticas entre ellas. Dentro de este grupo, *T. paratroviride* MA02 ($49,80 \pm 6,06$ %) mostró la inhibición más elevada, aunque aún distante del rendimiento del grupo A. Por su parte, *T. afroharzianum* AZEN20 ($47,00 \pm 9,97$ %) presentó una alta desviación estándar. En contraste, *T. asperelloides* CA07 ($45,67 \pm 2,49$ %) mostró una baja variabilidad. A diferencia de los resultados *in vitro*, no se observaron cepas en

grupos intermedios (por ejemplo, AB), lo que evidencia una clara separación entre las cepas más efectivas (grupo A) y el resto (grupo B). Esta distinción reafirma la superioridad estadística y biológica de los MVs producidos por las cepas AZEN06 y TI15 como agentes potenciales de control en condiciones *in vivo* (Figura 20).

Tabla 10

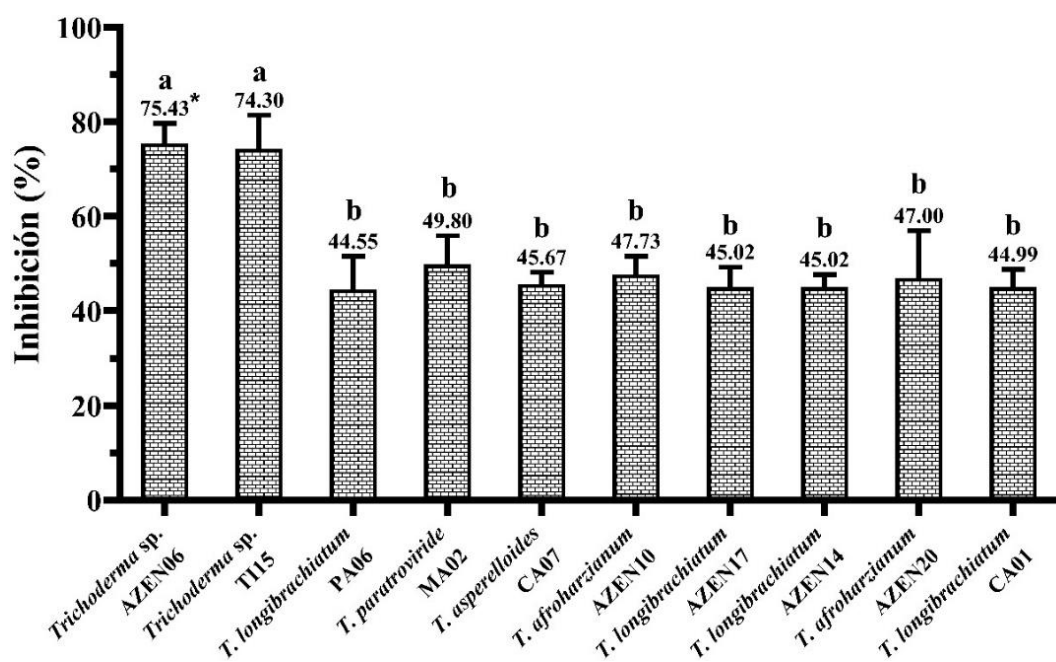
Efecto inhibitorio in vivo de los MVs de cepas de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea BO01

Especie	Código	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	75,43	4,26	A
<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	74,30	7,08	A
<i>T. paratroviride</i>	MA02	49,80	6,06	B
<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	47,73	3,83	B
<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	47,00	9,97	B
<i>T. asperelloides</i>	CA07	45,67	2,49	B
<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	45,02	4,22	B
<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	45,02	2,62	B
<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	44,99	3,77	B
<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	44,55	6,96	B

Nota. Las medias se agruparon mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Las letras indican diferencias significativas, las medias que no comparten una letra son estadísticamente diferentes entre sí. La inhibición se evaluó *in vivo* utilizando cámaras de microfumigación.

Figura 20

Efecto inhibitorio in vivo de los MVs de cepas de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea BO01



Nota. (*) Los datos representan el porcentaje de inhibición promedio causado por los metabolitos volátiles de 10 cepas de *Trichoderma* spp. sobre *B. cinerea* BO01 en bayas infectadas, evaluado mediante un sistema de cámaras de microfumigación. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas entre los

tratamientos ($p < 0.05$); las medias que no comparten una misma letra son significativamente diferentes entre sí. El ANOVA reveló diferencias significativas en el efecto inhibitorio entre las cepas ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de las medias.

Figura 21

Evaluación in vitro e in vivo de los MVs de Trichoderma frente a Botrytis cinerea BO01

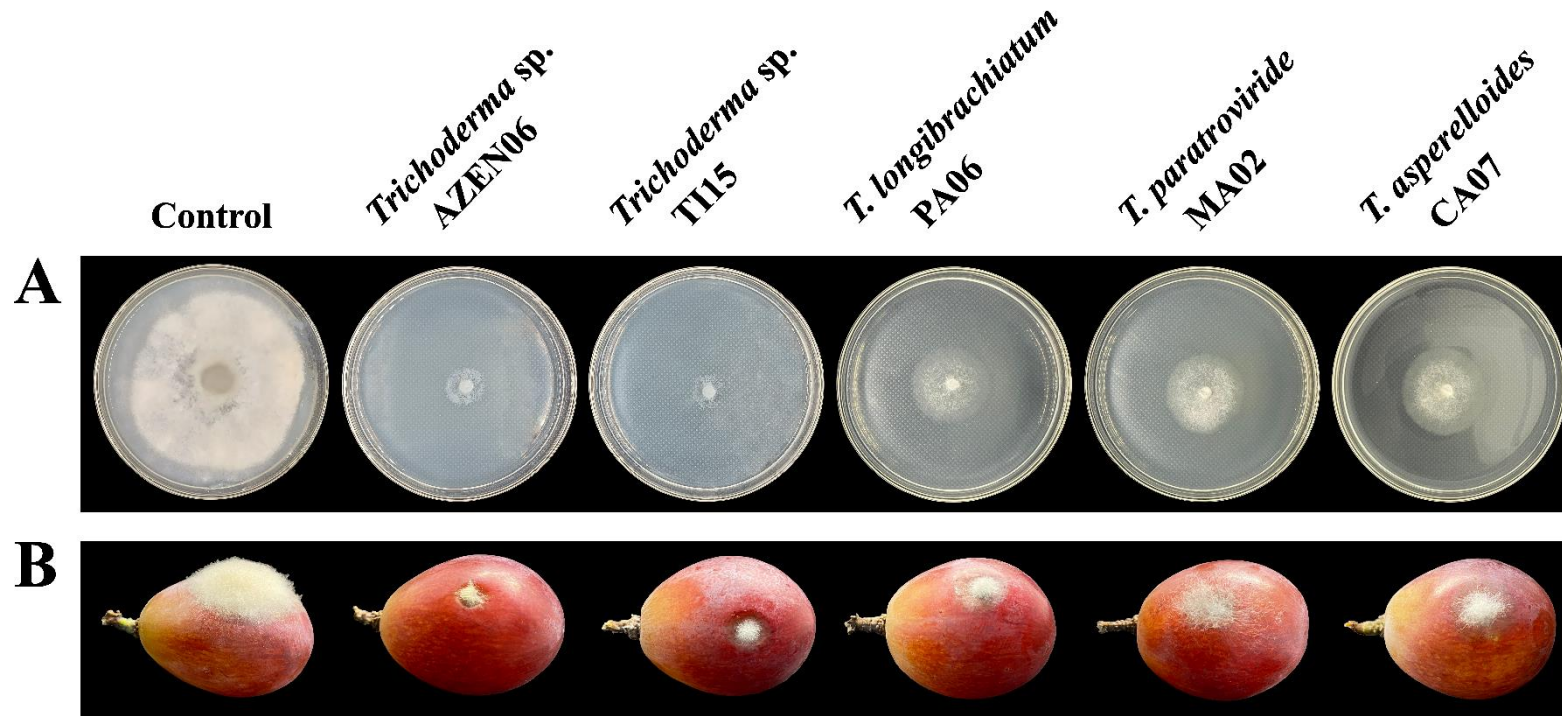
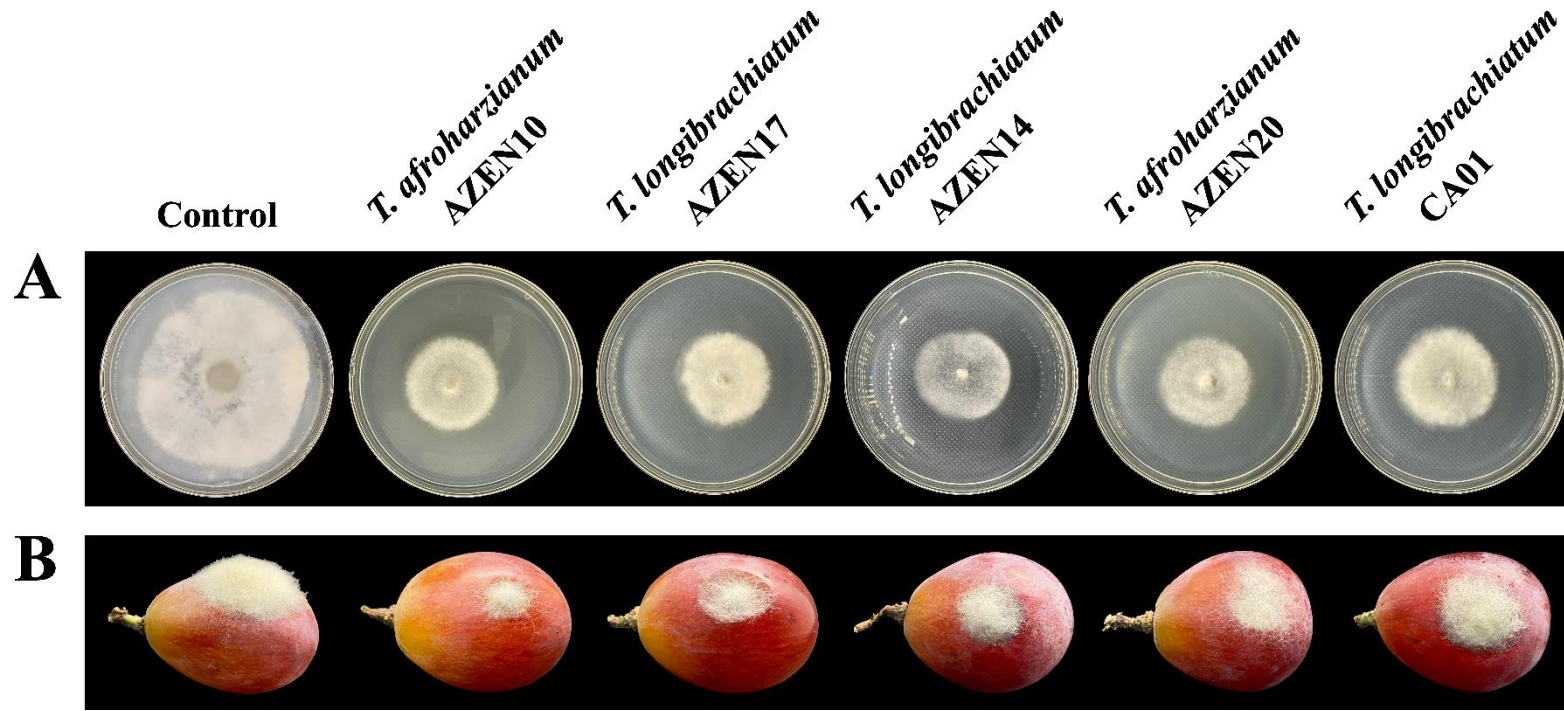


Figura 22 (continuación)



Nota. A. Ensayo *in vitro* mediante el método de placa invertida utilizando cepas de *Trichoderma* spp., con el fin de evaluar la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* por exposición a metabolitos volátiles. B. Ensayo *in vivo* en bayas de uva de mesa, variedad Red Globe, infectadas con *B. cinerea*, empleando una cámara de micofumigación según el método descrito por Bello *et al.* (2022). Se evaluó el desarrollo del patógeno bajo diferentes tratamientos con *Trichoderma* spp.

4.3.4. Efecto de metabolitos no volátiles (MNVs)

4.3.4.1. Efecto inhibitorio *in vitro* de los MNVs de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea*

Los resultados obtenidos demuestran un efecto inhibitorio claramente dependiente de la concentración de los extractos de metabolitos no volátiles de *Trichoderma* aplicados. Se evidenció una correlación positiva entre la dosis de extractos y el porcentaje de inhibición de *B. cinerea* BO01, observándose un incremento significativo de la eficacia antifúngica a medida que se aumentó la concentración del 30 % al 40 % y, finalmente, al 50 % ($p < 0,05$; ANOVA) (Anexos 6, 7 y 8). Este patrón demuestra que los metabolitos extracelulares de *Trichoderma* spp. ejercen un control proporcional a su disponibilidad en el medio. Se identificaron diferencias marcadas entre especies y cepas de *Trichoderma* en cuanto a su capacidad inhibitoria, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) (Tabla 11). Entre las especies más eficaces, *T. afroharzianum* (cepas AZEN10 y AZEN20) se destacó

en todas las concentraciones evaluadas, alcanzando un valor máximo de inhibición de $80,81 \pm 8,03$ a 50 % de concentración del extracto. Su comportamiento estadísticamente consistente (grupo A en 30 % y 40 %; AB en 50 %) sugiere una producción estable de metabolitos no volátiles antifúngicos. Asimismo, *T. asperelloides* CA07 mostró un desempeño destacado a 50 % ($68,61 \pm 7,49$ %), superando a varias cepas de *T. longibrachiatum*. Por otro lado, *T. longibrachiatum* presentó una notable variabilidad. Algunas cepas, como CA01, AZEN17 y AZEN14, mostraron incrementos progresivos de inhibición con la dosis, aunque con menores porcentajes que otras especies. La cepa *T. longibrachiatum* PA06, por ejemplo, mostró baja eficacia a 30 % ($17,75 \pm 2,12$ %), pero un notable aumento a 50 % ($53,45 \pm 1,40$ %), lo que sugiere que sus metabolitos requieren alcanzar umbrales críticos de concentración para ser efectivos. Las cepas *Trichoderma* sp. AZEN06 y TI15, también mostraron comportamientos interesantes. AZEN06 pasó de una inhibición mínima a 30 % ($7,73 \pm 1,68$ %) a un valor significativo a 50 % ($65,05 \pm 1,49$ %), lo que apunta a un efecto dependiente de la dosis. De forma similar, TI15 mostró una respuesta baja a concentraciones bajas, pero superó el 60 % de inhibición a 50 %, confirmando que el potencial biocontrolador puede optimizarse mediante ajustes en la concentración aplicada. La estabilidad y eficacia de los extractos varió también entre cepas. Por ejemplo, AZEN10 presentó una desviación estándar muy baja ($\pm 1,83$ %), lo cual refleja una mayor homogeneidad en la producción de metabolitos. En cambio, AZEN20 mostró una desviación mayor

($\pm 8,03$ %), lo que podría indicar variabilidad en la producción de metabolitos. *T. paratroviride* MA02, mostró una alta desviación estándar a 40 % ($\pm 6,32$ %) (Figura 22A) (Figura 25A). Al comparar con el fungicida químico tebuconazol, se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$) (Anexo 9) en la eficacia inhibitoria. El tebuconazol alcanzó un $97,50 \pm 0,2$ % de inhibición (grupo A), superando incluso los valores máximos obtenidos con los extractos a 50 %. Esto evidencia la brecha aún existente entre las alternativas biológicas y los agentes químicos sintéticos en términos de eficacia inmediata. Los extractos crudos de *Trichoderma* también mostraron una relación dosis-respuesta positiva. A 50%, alcanzaron un promedio de inhibición de $64,69 \pm 10,92$ %, mientras que a 40 % y 30 % se observaron valores de $42,86 \pm 17,63$ % y $25,14 \pm 17,07$ %, respectivamente. La clara separación entre grupos estadísticos (B, C y D) (Tabla 12) confirma que la concentración de los metabolitos extracelulares es un factor determinante para la eficacia de *Trichoderma* spp. (Figura 22B).

Tabla 11

Efecto inhibitorio in vitro de los MNVs de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea BO01 a diferentes concentraciones

Concentración MNVs*	Especie	Código	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
30 %	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	56,21	6,80	A
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	54,97	3,83	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	33,01	1,96	B
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	26,80	4,07	BC
	<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	17,75	2,12	CD
	<i>T. asperelloides</i>	CA07	16,01	2,34	DE
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	15,80	0,70	DE
	<i>T. paratroviride</i>	MA02	14,93	3,11	DE
	<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	8,17	2,75	DE
	<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	7,73	1,68	E
40 %	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	72,03	4,37	A
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	72,00	4,07	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	44,66	3,93	B
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	43,80	2,27	BC
	<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	42,13	3,47	BCD
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	41,06	4,08	BCD
	<i>T. paratroviride</i>	MA02	32,94	6,32	BCDE
	<i>T. asperelloides</i>	CA07	28,77	7,51	CDE

	<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	27,30	7,51	DE
	<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	23,91	6,67	E
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	80,81	8,03	A
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	80,12	1,83	AB
	<i>T. asperelloides</i>	CA07	68,61	7,49	ABC
	<i>T. paratroviride</i>	MA02	66,41	3,61	ABCD
50 %	<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	65,05	1,49	BCD
	<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	63,55	4,14	CD
	<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	59,09	5,17	CD
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	58,49	6,25	CD
	<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	53,45	1,40	CD
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	51,28	7,01	D

Nota. Los valores representan el porcentaje medio de inhibición del crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* BO01 por metabolitos no volátiles producidos por cepas de *Trichoderma* spp. El análisis estadístico se realizó mediante prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). * MNVs: Metabolitos no volátiles.

Tabla 12

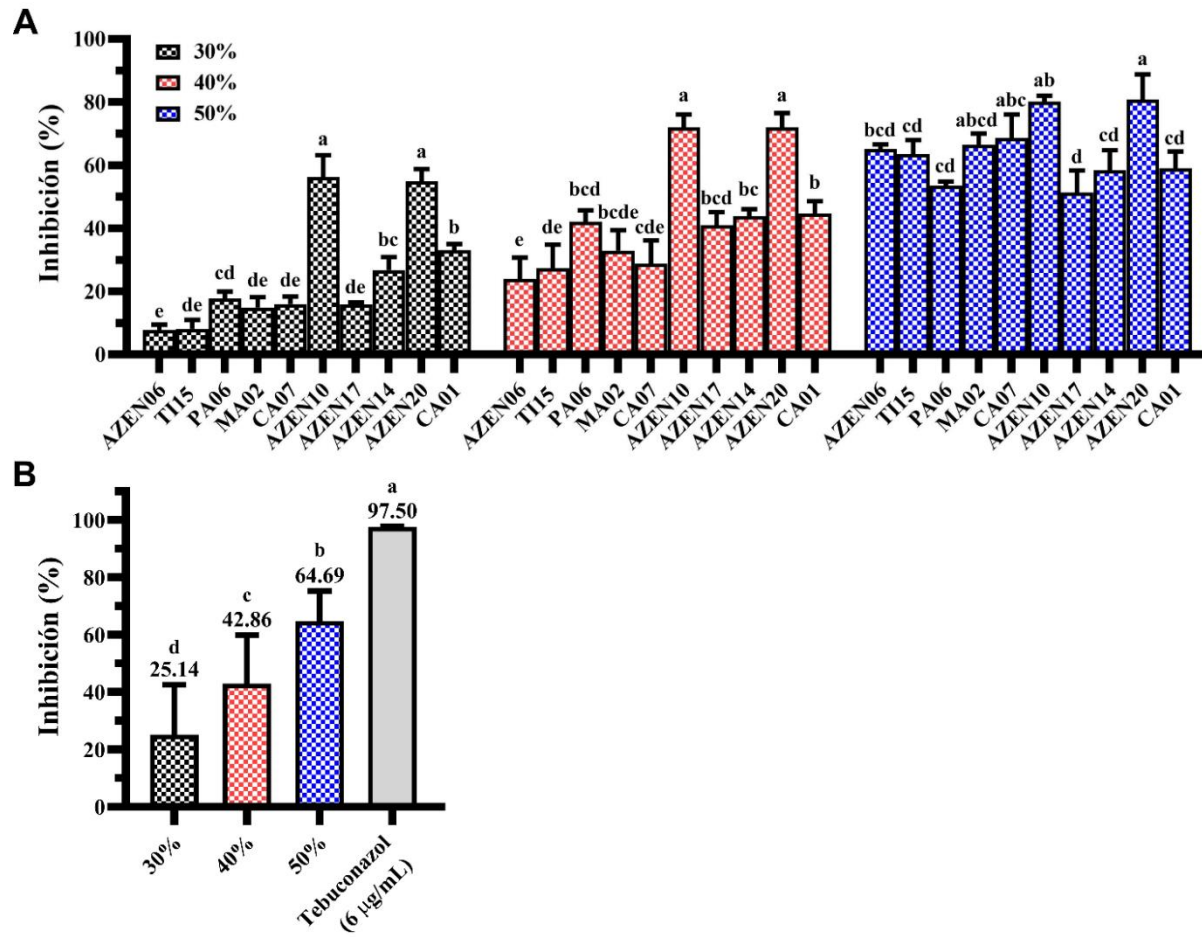
Porcentaje de inhibición in vitro de Botrytis cinerea BO01 por MNVs de Trichoderma spp. y tebuconazol a diferentes concentraciones

Concentración MNVs*	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
Tebuconazol (6 $\mu\text{g/mL}$)	97,50	0,2	A
50 %	64,69	10,92	B
40 %	42,86	17,63	C
30 %	25,14	17,07	D

Nota. Los valores corresponden a la media (%) de inhibición del crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* BO01. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). * MNVs: Metabolitos no volátiles.

Figura 23

Efecto inhibitorio in vitro de los MNVs de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea BO01 a diferentes concentraciones



Nota. A. Inhibición *in vitro* del crecimiento de *B. cinerea* BO01 por metabolitos no volátiles de diferentes cepas de *Trichoderma* spp., evaluados a concentraciones del 30 %, 40 % y 50 %. Las letras sobre las barras indican grupos estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). B. Comparación del promedio de inhibición general por concentración con respecto al fungicida comercial tebuconazol (6 $\mu\text{g/mL}$).

4.3.4.2. Efecto inhibitorio *in vitro* de los MNVs de *Trichoderma* spp, sobre la germinación de conidios de *Botrytis cinerea*

Los metabolitos no volátiles (MNVs) producidos por cepas de *Trichoderma* spp. ejercieron un efecto inhibitorio significativo sobre la germinación de conidios de *B. cinerea* BO01, mostrando una clara relación dosis-respuesta. A medida que se incrementó la concentración de MNVs (30 %, 40 % y 50 %), se observó un aumento progresivo en el porcentaje de inhibición, con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) (Anexos 10, 11 y 12) (Tabla 13).

A una concentración del 30 %, la inhibición osciló entre el $49,37 \pm 1,47$ % *T. longibrachiatum* CA01 y el $59,08 \pm 4,36$ % *T. afroharzianum* AZEN20. El análisis estadístico agrupó las cepas en dos categorías principales: el grupo A, conformado únicamente por AZEN20, y el grupo B, representado por CA01. Cepas de *T. afroharzianum* AZEN10, *T. paratroviride* MA02, *T. asperelloides* CA07, así

como varias cepas de *T. longibrachiatum* AZEN14, AZEN17 y PA06, y *Trichoderma* sp. TI15 y AZEN06, ocuparon una posición intermedia, sin diferencias significativas respecto a ambos grupos (transición AB). Este hallazgo destaca que *T. afroharzianum* AZEN20 fue la única cepa significativamente más eficaz que *T. longibrachiatum* CA01, evidenciando diferencias interespecíficas en la producción de metabolitos antifúngicos (Figura 23A).

Al incrementar la concentración al 40 %, la inhibición aumentó con un rango que varió de $54,25 \pm 1,90$ % (CA01) a $65,83 \pm 4,53$ % (AZEN20). En este caso, se observó una mayor diversidad de cepas en el grupo A, incluyendo a *T. afroharzianum* AZEN20, *T. afroharzianum* AZEN10, *T. paratroviride* MA02 y *T. asperelloides* CA07, que no presentaron diferencias significativas entre sí, pero sí frente a *T. longibrachiatum* CA01, que fue nuevamente ubicada en el grupo B. Cepas como *T. longibrachiatum* AZEN17, *T. longibrachiatum* AZEN14 y *T. longibrachiatum* PA06 se ubicaron en la transición AB, reafirmando la existencia de variabilidad intraespecífica en la respuesta antifúngica (Figura 23A).

A la concentración más alta evaluada (50 %), la inhibición alcanzó su máximo con un $81,53 \pm 4,55$ % en *T. afroharzianum* AZEN20, mientras que *T. longibrachiatum* CA01 mostró la menor eficacia ($63,56 \pm 4,06$ %). El análisis estadístico distribuyó a las cepas en varios grupos con solapamientos parciales: *T. afroharzianum* AZEN20 se mantuvo como la cepa más efectiva (grupo A), seguida de *T. longibrachiatum* AZEN10 (grupo AB), y otras cepas como *T. asperelloides*

CA07 y *T. paratroviride* MA02 se situaron en el grupo ABC. A medida que disminuyó la eficacia, las cepas fueron agrupadas en los grupos BCD, CD y finalmente D, en el cual se ubicó *T. longibrachiatum* CA01. Estos resultados reflejan una diferenciación clara no solo entre especies, sino también entre cepas de una misma especie (Figura 23A).

En comparación con un control químico, el fungicida tebuconazol (6 $\mu\text{g/mL}$) mostró una inhibición significativamente superior ($88,51 \pm 0,94 \%$), ubicándose por encima de todas las concentraciones de MNVs evaluadas. La diferencia fue más notoria a concentraciones menores de MNVs de 30 % y 40 %, las inhibiciones promedio fueron de $52,24 \pm 4,37 \%$ y $62,46 \pm 5,12 \%$, respectivamente, con brechas de 36,27 % y 26,05 % frente al fungicida. A 50 %, la cepa más efectiva (AZEN20) alcanzó un $81,53 \pm 4,55 \%$, reduciendo la diferencia con el tebuconazol a solo 6,98 %. Sin embargo, se evidenció una mayor variabilidad en la acción de los MNVs, reflejada en sus desviaciones estándar, en contraste con la alta consistencia del fungicida químico ($DE = 0,94 \%$) (Anexo 13) (Tabla 14) (Figura 23B).

En conjunto, los hallazgos permiten concluir que los MNVs de *Trichoderma* spp. presentan un efecto antifúngico dependiente de la concentración, con incrementos significativos en la inhibición de *B. cinerea* a medida que se eleva la dosis. Las cepas de *T. afroharzianum* AZEN20 y AZEN10 demostraron ser consistentemente las más efectivas, incluso superando a otras especies y cepas

como *T. longibrachiatum* CA01. Aunque ninguna de las concentraciones igualó la inhibición lograda por el fungicida tebuconazol, los MNVs al 50 % mostraron una eficacia suficientemente alta (> 80 %) como para considerarlos alternativas viables.

Tabla 13

Efecto inhibitorio in vitro de los MNVs de Trichoderma spp. sobre la germinación de conidios de Botrytis cinerea BO01 a diferentes concentraciones

Concentración MNVs*	Especie	Código	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
30 %	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	59,08	4,36	A
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	56,49	2,17	AB
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	52,41	3,11	AB
	<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	51,89	2,40	AB
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	50,92	1,24	AB
	<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	50,92	6,89	AB
	<i>T. paratroviride</i>	MA02	50,66	1,66	AB
	<i>T. asperelloides</i>	CA07	50,34	2,09	AB
	<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	50,34	2,09	AB
	<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	49,37	1,47	B
40 %	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	65,83	4,53	A
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	65,63	2,68	A
	<i>T. paratroviride</i>	MA02	65,49	2,73	A

	<i>T. asperelloides</i>	CA07	65,17	2,15	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	63,25	2,26	AB
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	63,10	3,40	AB
	<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	62,30	4,91	AB
	<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	61,84	3,72	AB
	<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	57,70	2,77	AB
	<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	54,25	1,90	B
	<i>T. afroharzianum</i>	ZEN20	81,53	4,55	A
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	79,94	1,09	AB
	<i>T. asperelloides</i>	CA07	74,71	3,97	ABC
	<i>T. paratroviride</i>	MA02	73,21	2,47	ABC
50 %	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	71,31	3,44	BCD
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	71,13	1,54	BCD
	<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	70,38	2,12	CD
	<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	69,82	0,89	CD
	<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	69,77	3,45	CD
	<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	63,56	4,06	D

Nota. Los valores representan el porcentaje medio de inhibición de la germinación de conidios *in vitro* de *B. cinerea* BO01, por metabolitos no volátiles producidos por cepas de *Trichoderma* spp. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). *MNVs: Metabolitos no volátiles.

Tabla 14

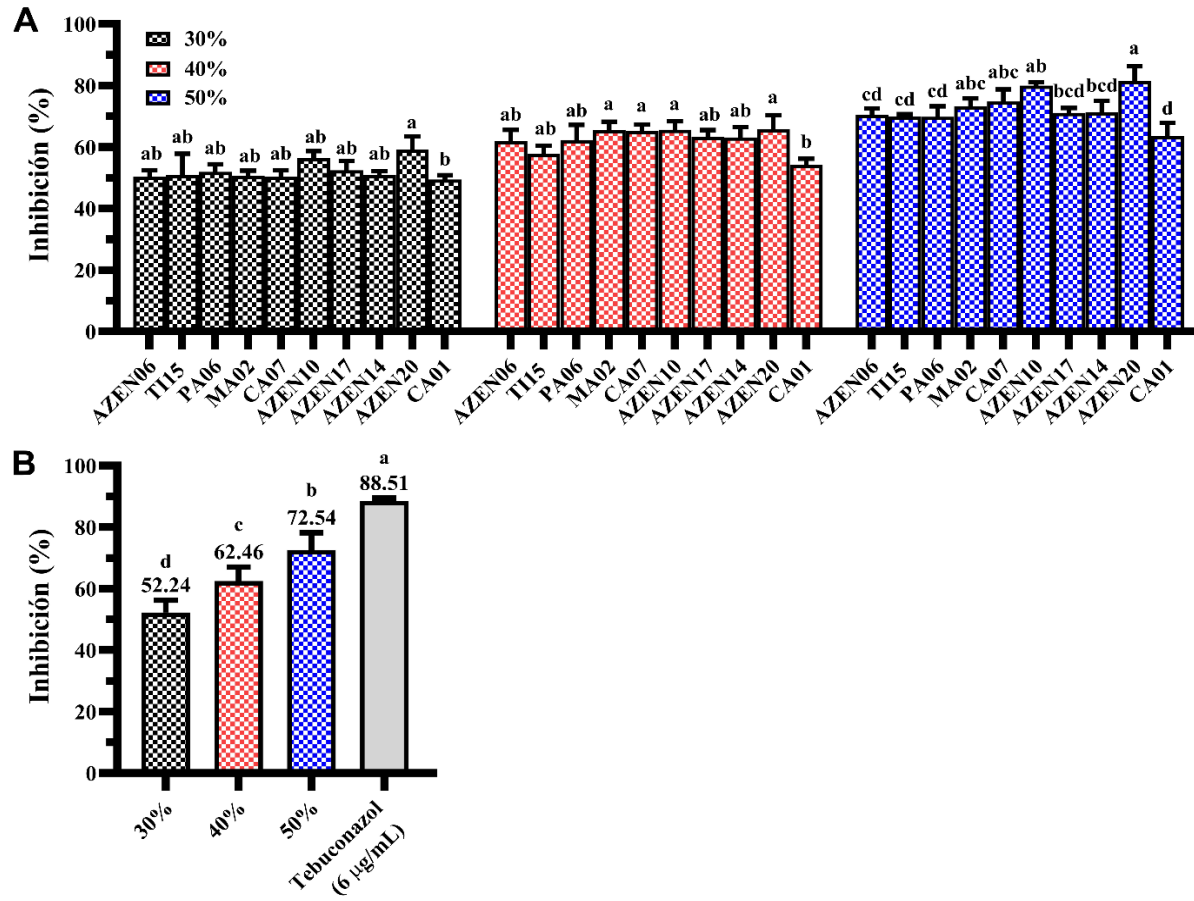
Porcentaje de inhibición in vitro sobre la germinación de conidios de Botrytis cinerea BO01 por MNVs de Trichoderma spp., y tebuconazol a diferentes concentraciones.

Concentración MNVs*	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
Tebuconazol (6 $\mu\text{g/mL}$)	88,51	0,94	A
50 %	72,54	7,85	B
40 %	62,46	5,12	C
30 %	52,24	4,37	D

Nota. Los valores corresponden a la media (%) de inhibición de la germinación de conidios *in vitro* de *B. cinerea* BO01. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). *MNVs: Metabolitos no volátiles.

Figura 24

Efecto inhibitorio in vitro de los MNVs de Trichoderma spp. sobre la germinación de conidios de Botrytis cinerea BO01 a diferentes concentraciones



Nota. A. Inhibición *in vitro* de la germinación de conidios de *B. cinerea* BO01 por metabolitos no volátiles de diferentes cepas de *Trichoderma* spp., evaluados a concentraciones del 30 %, 40 % y 50 %. Las letras sobre las barras indican grupos estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). B. Comparación del promedio de inhibición general por concentración con respecto al fungicida comercial tebuconazol (6 $\mu\text{g/mL}$).

4.3.4.3. Efecto inhibitorio *in vivo* de los MNVs de *Trichoderma* spp, sobre *Botrytis cinerea*

Los MNVs de *Trichoderma* spp. demostraron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración sobre *B. cinerea* BO01 en bayas de uva de mesa variedad Red Globe, con un incremento significativo en la eficacia antifúngica conforme se elevó la concentración de los extractos (Figura 25B). A un 30 % de MNVs, la inhibición varió entre $9,55 \pm 1,32$ % en *T. longibrachiatum* CA01 y $25,29 \pm 1,79$ % de *T. afroharzianum* AZEN10, evidenciando diferencias en la capacidad inhibitoria entre cepas. Al incrementar la concentración al 40 %, se observó un rango de inhibición de $27,38 \pm 9,37$ % (CA01) a $42,16 \pm 5,01$ % (AZEN10), mientras que, al 50 %, las cepas *T. afroharzianum* AZEN20 y AZEN10 alcanzaron las máximas inhibiciones registradas ($55,18 \pm 17,51$ % y $54,85 \pm 9,96$ %, respectivamente). Esta variación dosis-respuesta sugiere un umbral crítico

alrededor del 50 % de concentración, donde la actividad antifúngica se intensifica, aunque sin superar la eficacia del fungicida químico (Tabla 15) (Figura 24A).

La comparación con tebuconazol (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que mostró una inhibición casi total ($92,18 \pm 1,43$ %), reveló una brecha cuantitativa del 44,69 % frente a los MNVs al 50 %. Esta diferencia no solo subraya la superioridad del fungicida químico en términos de eficacia, sino también su consistencia, reflejada en una desviación estándar baja ($\text{DE} = 1,43$ %) (Tabla 16) (Figura 24B) (Anexo 17). En contraste, la alta variabilidad observada en los MNVs, particularmente en cepas como *T. afroharzianum* AZEN20 ($\text{DE} = 17,51$ % a 50 %) y *Trichoderma asperelloides* CA07 ($\text{DE} = 11,30$ % a 50 %), sugiere fluctuaciones en la producción o estabilidad de los metabolitos activos.

A nivel intra e interespecífico, se identificaron disparidades notables. Las cepas de *T. afroharzianum* (AZEN10 y AZEN20) destacaron por su eficacia sostenida en todas las concentraciones, aunque con diferencias en su estabilidad, ya que *T. afroharzianum* AZEN10 mostró una desviación estándar moderada ($\leq 9,96$ %), mientras que AZEN20 presentó una variabilidad elevada ($\text{DE} = 17,51$ %). Por otro lado, *T. asperelloides* CA07 exhibió una inhibición intermedia, pero errática ($50,13 \pm 11,30$ % a 50 %), en condiciones *in vivo*. Dentro de *T. longibrachiatum*, la heterogeneidad fue marcada, pues mientras *T. longibrachiatum* AZEN14 logró una inhibición relevante ($50,55 \pm 6,65$ % a 50 %), *T. longibrachiatum* CA01 mostró el desempeño más bajo ($41,56 \pm 5,81$ % a 50 %), lo que resalta que la actividad

antifúngica no es un atributo uniforme dentro de la especie. En contraste, *T. paratroviride* MA02 se distinguió por su progresión estable y predecible, con una desviación estándar $\leq 4,46$ %.

El análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) agrupó a todas las cepas dentro de la misma categoría (grupo A) para cada concentración, lo que indica la ausencia de diferencias significativas entre ellas. No obstante, las diferencias numéricas entre medias podrían tener relevancia biológica (Anexos 14, 15 y 16).

Tabla 15

Efecto inhibitorio in vivo de los MNVs de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea en bayas de uva de mesa variedad Red Globe

Concentración MNVs*	Especie	Código	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
30 %	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	25,29	1,79	A
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	24,87	1,46	A
	<i>T. asperelloides</i>	CA07	21,65	9,16	A
	<i>T. paratroviride</i>	MA02	18,45	2,21	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	18,27	4,02	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	15,74	8,06	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	12,98	7,49	A
	<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	11,88	6,18	A
	<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	9,70	8,78	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	9,55	1,32	A
40 %	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	42,16	5,01	A
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	40,46	13,16	A
	<i>T. paratroviride</i>	MA02	37,47	0,86	A
	<i>T. asperelloides</i>	CA07	35,89	1,62	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	33,26	1,66	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	32,75	1,64	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	32,69	4,48	A

	<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	31,38	5,20	A
	<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	29,44	6,00	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	27,38	9,37	A
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN20	55,18	17,51	A
	<i>T. afroharzianum</i>	AZEN10	54,85	9,96	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN14	50,55	6,65	A
	<i>T. asperelloides</i>	CA07	50,13	11,30	A
	<i>T. paratroviride</i>	MA02	49,71	4,46	A
50 %	<i>T. longibrachiatum</i>	AZEN17	45,92	1,23	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	PA06	43,71	6,65	A
	<i>Trichoderma</i> sp.	AZEN06	41,65	3,22	A
	<i>Trichoderma</i> sp.	TI15	41,65	3,22	A
	<i>T. longibrachiatum</i>	CA01	41,56	5,81	A

Nota. Los valores representan el porcentaje medio de inhibición in vivo de *B. cinerea* BO01 en bayas de uva de mesa variedad Red Globe, inducido por metabolitos no volátiles (MNVs) producidos por cepas de *Trichoderma* spp. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). *MNVs: Metabolitos no volátiles.

Tabla 16

Porcentaje de inhibición in vivo de Botrytis cinerea BO01 por MNVs de Trichoderma spp. y tebuconazol a diferentes concentraciones

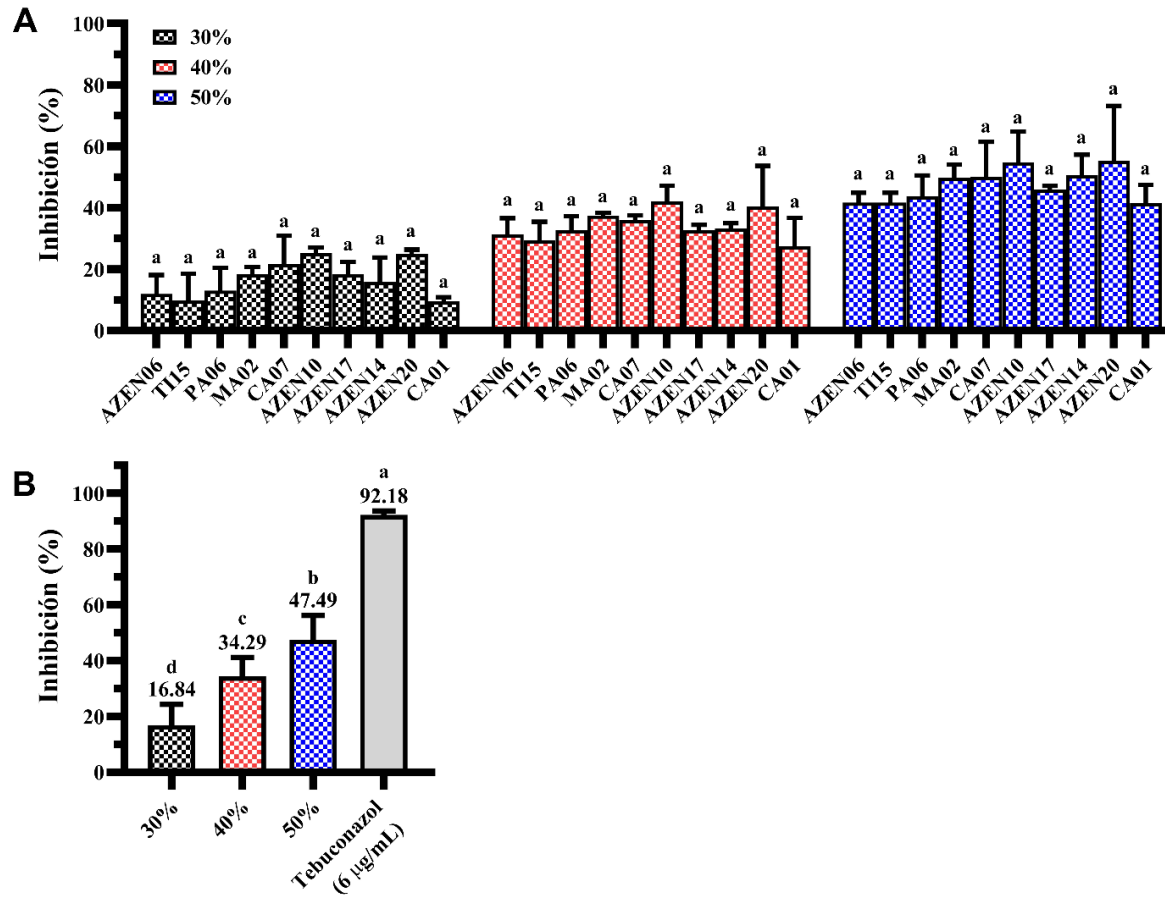
Concentración MNVs*	Media (%)	Desviación estándar	Grupo Tukey ($\alpha = 0.05$)
Tebuconazol (6 $\mu\text{g/mL}$)	92,18	1,43	A
50 %	47,49	10,85	B
40 %	34,29	9,12	C
30 %	16,84	8,21	D

Nota. Los valores corresponden a la media (%) de inhibición *in vivo* de *B. cinerea* BO01. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

**MNVs*: Metabolitos no volátiles.

Figura 25

Efecto inhibitorio in vivo de los MNVs de Trichoderma spp. sobre Botrytis cinerea BO01 en bayas de uva de mesa variedad Red Globe



Nota. A. Inhibición *in vivo* de metabolitos no volátiles (MNVs) de *Trichoderma* spp. sobre *B. cinerea* BO01 en bayas de uva de mesa, variedad Red Globe, evaluados a concentraciones del 30 %, 40 % y 50 %. Las letras sobre las barras indican grupos estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). B. Comparación del promedio de inhibición general por concentración con respecto al fungicida comercial tebuconazol (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que presentó un 92,18 % de inhibición, significativamente superior a los tratamientos biológicos.

Figura 26

Evaluación in vitro e in vivo de MNVs de Trichoderma frente a Botrytis cinerea

BO01

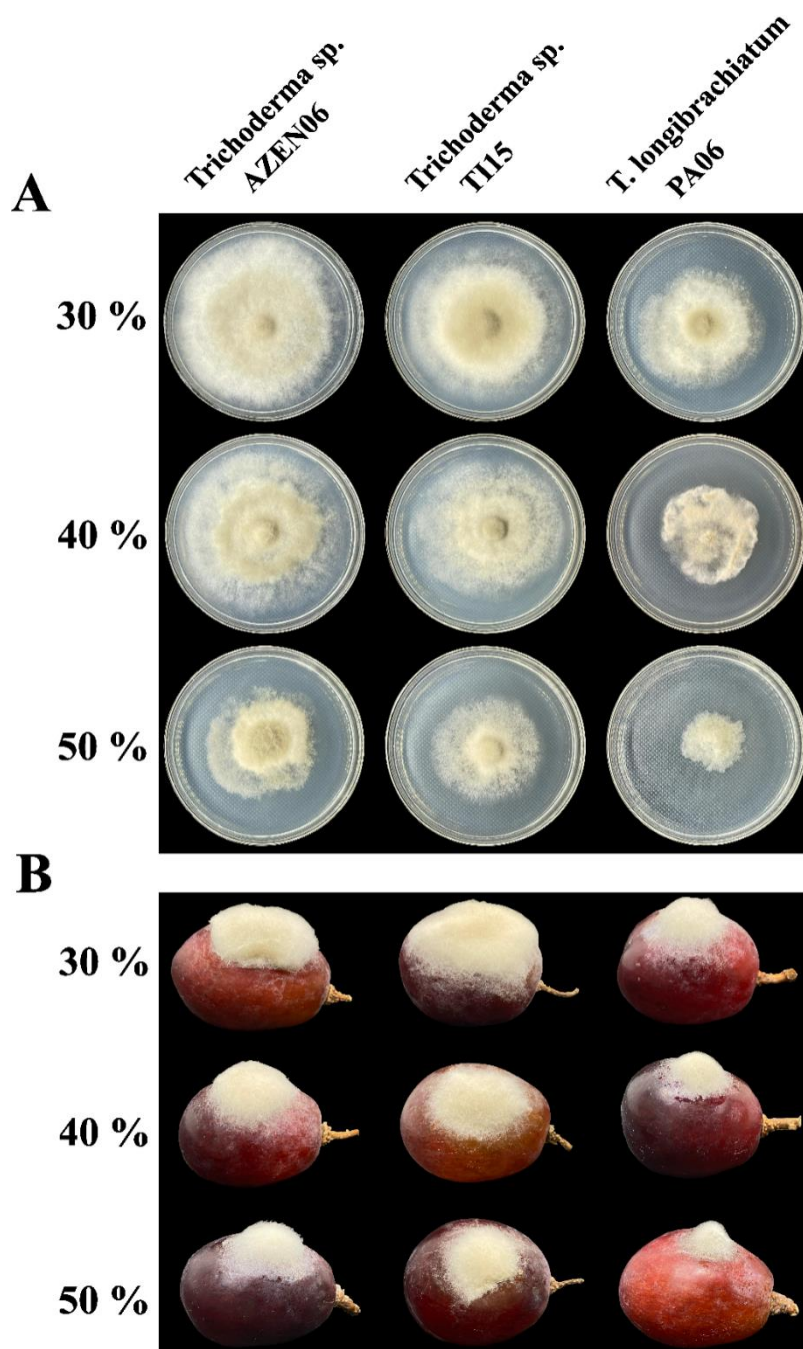


Figura 27 (continuación)

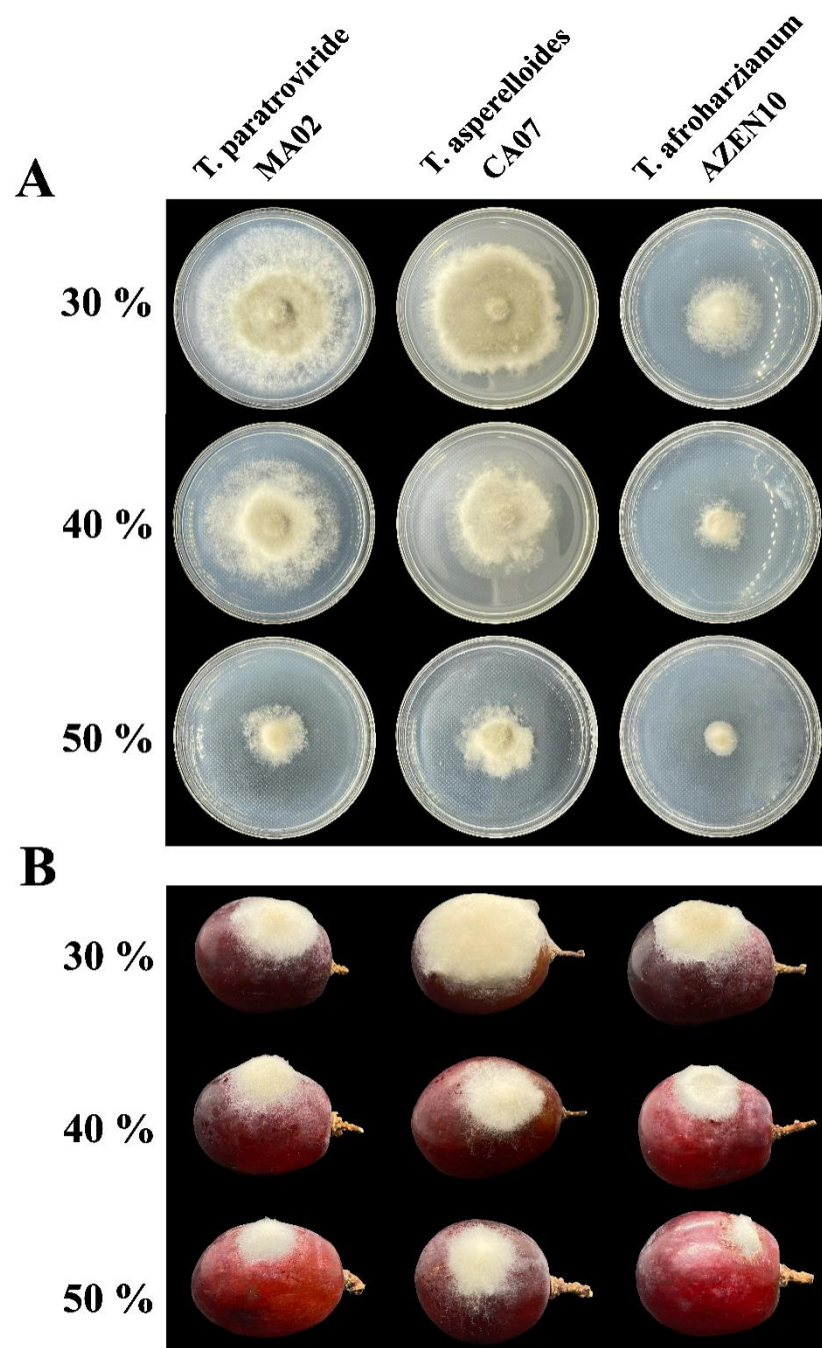


Figura 28 (continuación)

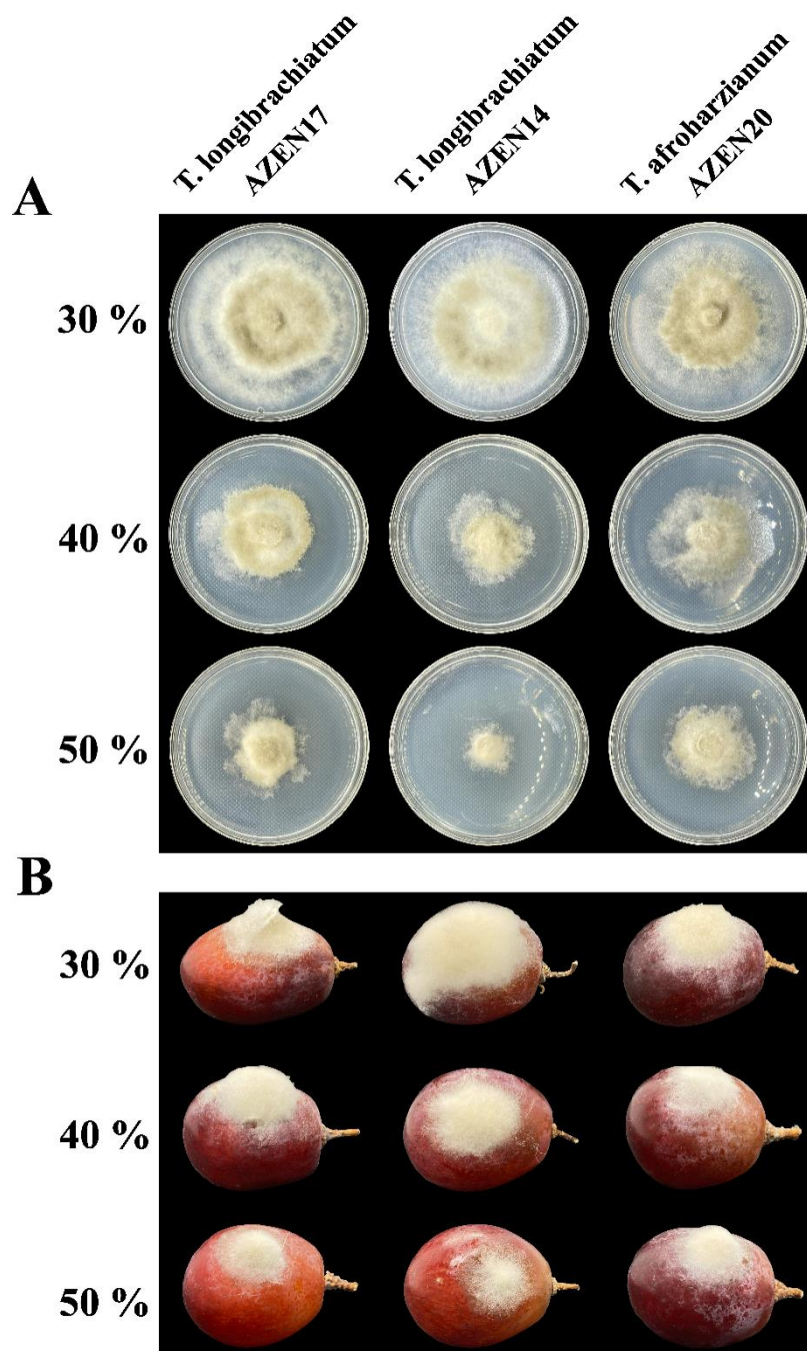
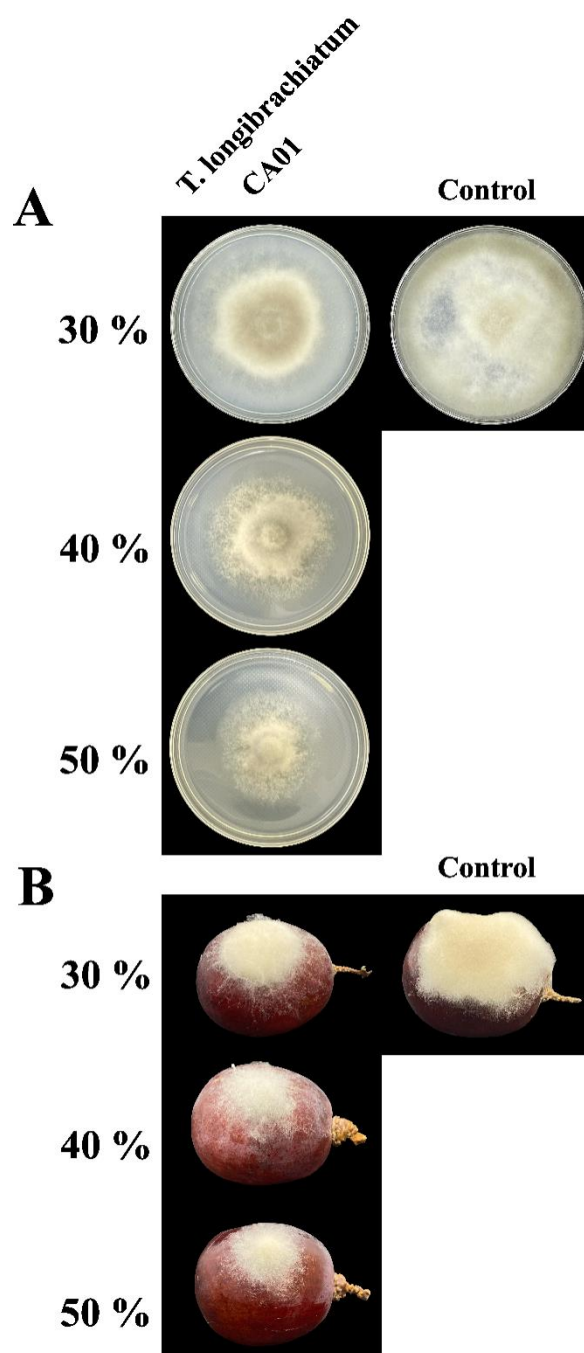


Figura 29 (continuación)



Nota. La figura presenta la evaluación antifúngica de metabolitos no volátiles (MNVs) de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis cinerea* BO01 mediante dos enfoques: A. En el método del alimento envenenado (*in vitro*), se incorporaron concentraciones de MNVs al 30 %, 40 % y 50 % (v/v) en medio PDA para analizar su efecto directo sobre el crecimiento micelial del patógeno; B. En los *ensayos in vivo*, se aplicaron las mismas concentraciones de MNVs sobre bayas intactas de uva de mesa variedad Red Globe, bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C), evaluando la eficacia antifúngica en un sistema más cercano al entorno natural del hospedero.

V. DISCUSIÓN

La podredumbre gris, causada por *Botrytis cinerea*, constituye una de las enfermedades más perjudiciales para la producción de uva de mesa (*Vitis vinifera*), ya que compromete los racimos desde la etapa de cultivo hasta su comercialización. Su control se basa principalmente en la aplicación de fungicidas químicos, cuyo uso implica altos costos y una eficacia limitada (Dean *et al.*, 2012; Petrasch *et al.*, 2019). En contraste, especies del género *Trichoderma* representan una alternativa sostenible y eficaz para el manejo de enfermedades agrícolas, debido a su capacidad para inhibir patógenos a través de mecanismos como el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia, además de inducir respuestas de defensa en las plantas, favorecer su crecimiento, optimizar la nutrición y mejorar la calidad del suelo. Estos atributos contribuyen a reducir la dependencia del uso de fungicidas químicos (Harman, 2006; Sood *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2023; Asghar *et al.*, 2024). En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial de los metabolitos extracelulares producidos por cepas de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de *B. cinerea*, mediante ensayos realizados tanto *in vitro* como *in vivo*.

La riqueza de *Trichoderma* en Tacna, con 118 aislamientos, incluidos 85 rizosféricos y 33 endofíticos, refleja su éxito ecológico en ambientes agrícolas y de alta montaña (hasta 4510 m s. n. m. en Palca), lo que resulta coherente con su reconocida plasticidad para colonizar nichos diversos. Esta versatilidad refuerza su

papel como simbioses de plantas y agentes de biocontrol. Estos hongos pueden colonizar eficazmente las raíces, incluidas las de vid, al suprimir las respuestas tempranas de defensa de las plantas para establecer relaciones endofíticas (Brotman *et al.*, 2013; Carro-Huerga *et al.*, 2020).

La identificación molecular de especies de *Trichoderma* ha experimentado notables avances gracias al enfoque multilocus, basado en los genes ITS, *tefl* y *rpb2*, el cual proporciona una mayor precisión y resolución filogenética en comparación con el uso de loci individuales (Jaklitsch & Voglmayr, 2015; Dou *et al.*, 2020; Cai & Druzhinina, 2021). Este enfoque permitió confirmar la presencia de *Trichoderma paratroviride*, *Trichoderma asperelloides*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma afroharzianum* en nuestro estudio, especies ampliamente asociadas con actividad antifúngica (Marik *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2022; Tyśkiewicz *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2023; Boukaew *et al.*, 2024; Ismaiel *et al.*, 2024; Philip *et al.*, 2024). La robustez estadística de los nodos en el árbol filogenético (Figura 6) reduce significativamente el riesgo de una identificación errónea de las cepas analizadas. Esta precisión resulta esencial, dado que algunas cepas de *Trichoderma* actúan como agentes de biocontrol efectivos, mientras que otras pueden comportarse como patógenos fúngicos (Ospina-Giraldo *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2000; Samuels *et al.*, 2002). Por tanto, una delimitación taxonómica rigurosa es indispensable para garantizar la selección de cepas seguras y eficaces. Los aislamientos *Trichoderma* sp. AZEN06 y TI15, no identificados a

nivel de especie, pero cercanos a *Trichoderma viridialbum*, presentan una divergencia genética considerable (MLBP/BIPP = 86/0,99), lo que apunta a la posible existencia de linajes crípticos. Este fenómeno, recurrente en *Trichoderma*, se asocia con procesos de especiación reciente, donde las diferencias moleculares no se reflejan aún en caracteres morfológicos. Diversos estudios han reportado patrones similares dentro del género, destacando la utilidad de los análisis multilocus y genómicos (Druzhinina & Kubicek, 2005; Druzhinina *et al.*, 2011; Jaklitsch *et al.*, 2013; Jaklitsch & Voglmayr, 2015; Kubicek *et al.*, 2019). Estos taxones crípticos poseen un amplio repertorio de genes asociados al metabolismo secundario, lo que les permite sintetizar metabolitos con actividades antifúngicas y antimicrobianas. Esta capacidad no solo les permite competir ecológicamente en su entorno, sino que también las convierte en agentes efectivos de biocontrol frente a hongos fitopatógenos (Zeilinger *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2020).

Respecto a la caracterización morfológica observada en *T. afroharzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. asperelloides* y *T. paratroviride*, que incluyen el patrón de crecimiento radial a las 72 horas a distintas temperaturas (20, 25, 30 y 35 °C), así como las características culturales y las observaciones microscópicas, particularmente la longitud de las fiálides, conidios y clamidosporas, se alinean con las descripciones morfológicas y los rangos morfométricos establecidos para estas especies, coincidiendo con las descripciones detalladas por Bissett (1984), Harman

& Kubicek (1998), Samuels *et al.* (2010), Samuels *et al.* (2012), Chaverri *et al.* (2015) y Jaklitsch & Voglmayr (2015).

Los resultados de la prueba de antibiosis indican que el crecimiento micelial de *B. cinerea* fue inhibido de manera significativa por los aislamientos de *Trichoderma* en el enfrentamiento dual. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial osciló entre el 66,22 % y el 88,45 %, siendo *T. longibrachiatum* AZEN14 el que presentó la mayor inhibición de *B. cinerea*. *T. afroharzianum* AZEN20 y AZEN10 mostraron valores de inhibición del 88,25 % y 87,63 %, respectivamente. Otros estudios reportan valores comparables para especies del mismo clado *Harzianum* frente al mismo fitopatógeno. Por ejemplo, *T. afroharzianum* TAS8 presentó una inhibición del 62 % (Hammad *et al.*, 2021), mientras que *Trichoderma harzianum* alcanzó valores de 82,34 % (Kuzmanovska *et al.*, 2018), 69,23 % (Bendahmane *et al.*, 2012), 43,71 % (Geng *et al.*, 2022), y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* TAET1 mostró valores del 80 % (Sánchez-Montesinos *et al.*, 2021). Asimismo, se reportó un valor de 31,09 % para *T. afroharzianum* F13M4 frente a *Moniliophthora roreri*, causante de la podredumbre helada de la mazorca del cacao (Leiva *et al.*, 2022). En cuanto a *T. longibrachiatum* AZEN14, AZEN17, PA06 y CA01, se obtuvo un valor promedio de 80,11 % de inhibición, valor que supera el 59 % reportado para *T. longibrachiatum* TLS6 (Hammad *et al.*, 2021), el 70,18 % para *T. longibrachiatum* TL 10202 (Bendahmane *et al.*, 2012) frente a *B. cinerea*, y el 31,07 % para *T. longibrachiatum* UCF5A_C1 enfrentado a

M. roreri (Leiva *et al.*, 2022). Asimismo, *T. asperelloides* CA07 alcanzó un 80,95 % de inhibición, valor comparable al 84,78 % registrado para *Trichoderma asperellum* T1 (Kuzmanovska *et al.*, 2018), pero considerablemente superior al 28,81 % reportado para *T. asperelloides* BLPF4_C1 frente a *M. roreri* (Leiva *et al.*, 2022). Por otro lado, *T. paratroviride* MA02 alcanzó un 79,75 % de antibiosis, superior al 62 % reportado para *Trichoderma atroviride* TAtC11 (Hammad *et al.*, 2021). Finalmente, se obtuvo un valor promedio de inhibición del 65,78 % para *Trichoderma* sp. AZEN06 y TI15, cercano a los valores reportados en especies del clado *Viridescens*, con un 65 % para *Trichoderma gamsi* TGS7 (Hammad *et al.*, 2021) y un 65,63 % para *Trichoderma viridescens* CCTCC-RW0017 (Saravanakumar *et al.*, 2018). La destacada actividad de antibiosis observada podría atribuirse a la producción conjunta de metabolitos difusibles y enzimas con acción sinérgica (Mukherjee *et al.*, 2012). Estudios han reportado que la producción de metabolitos secundarios por *Trichoderma* spp. puede variar en presencia y proporción según la cepa (Reino *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2012), y se ha documentado la síntesis de compuestos bioactivos como viridina, glioviridina, gliotoxina, harzianolida, tricozianinas A1 y B1, y trichodermina (Lumsden *et al.*, 1992; Di Pietro *et al.*, 1993; Schirmböck *et al.*, 1994; Elad, 1996). Si bien cada uno de estos compuestos posee un mecanismo antifúngico específico, la trichodermina ha sido identificada de manera particular por su capacidad para inhibir la síntesis

de proteínas ribosomales en hongos fitopatógenos, interfiriendo en su desarrollo celular (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991).

La prueba de micoparasitismo reveló diferencias significativas entre los grupos de especies estudiadas, con valores que oscilaron entre el 16,67 % y el 100 %. *T. afroharzianum* AZEN10 y AZEN20 alcanzaron un 100 % de micoparasitismo frente a *B. cinerea*, resultado similar al reportado por León *et al.* (2022) para *Trichoderma* sp., que también alcanzó un 100% frente al mismo fitopatógeno. Estudios previos reportaron este mismo valor en *T. harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma inhamatum*, *Trichoderma lentiforme*, *T. afroharzianum*, *Trichoderma afarasin* y *Trichoderma ovalisporum* frente a *M. roleri* (Bailey *et al.*, 2008; Reyes-Figueroa *et al.*, 2016; Leiva *et al.*, 2022). Evans *et al.* (2002) reportaron valores similares (100 %) para *Trichoderma spirale*, *T. virens* y *T. harzianum*, aislados endofíticos de *Theobroma gileri*, frente a *Crinipellis roleri* (actualmente *M. roleri*). Por su parte, Athinuwat *et al.* (2024) también reportaron un valor similar para *T. virens* frente a *Neopestalotiopsis clavispora*, agente causal del tizón floral en la flor de flamenco (*Anthurium andraeanum* L.). *T. asperelloides* CA07 presentó un 100 % de micoparasitismo; estudios previos reportaron este mismo valor en *T. asperelloides* F19M3, *T. asperellum* TTC023 y *Trichoderma hamatum* 219b frente a *M. roleri* (Bailey *et al.*, 2008; Reyes-Figueroa *et al.*, 2016; Leiva *et al.*, 2022). De manera similar, *T. paratroviride* MA02 también alcanzó un 100 % de micoparasitismo. Por el contrario, *T. longibrachiatum* AZEN14, AZEN17, PA06 y

CA01 presentó un valor promedio del 26,67 %, inferior a lo reportado por Leiva *et al.* (2022) para esta misma especie frente a *M. roreri*. De manera comparable, *Trichoderma* sp. AZEN06 y TI15 mostraron un valor promedio de 48,34 % de micoparasitismo. En base a ello, es importante destacar que el micoparasitismo es una característica común de las especies de *Trichoderma*. Druzhinina *et al.* (2011) mencionan que más de 1100 cepas de *Trichoderma* poseen actividad micoparasitaria frente a *B. cinerea*. Este proceso involucra una serie de eventos, que incluyen el reconocimiento temprano, el crecimiento dirigido, el contacto físico, la formación de estructuras especializadas como apresorios, y la inducción de enzimas degradadoras de la pared celular (Seidl *et al.*, 2009; Mukherjee *et al.*, 2012; Vos *et al.*, 2014; Phillip *et al.*, 2024).

El biocontrol no depende exclusivamente de la inhibición por antibiosis o del micoparasitismo por parte de *Trichoderma* spp. Calcular el potencial antagónico de ambos mecanismos permite analizar de manera integral y representativa su eficacia. Los resultados del potencial antagónico estuvieron en un rango de 50,61 % y 94,13 %. Los aislamientos de *T. afroharzianum* AZEN20 y AZEN10, *T. asperelloides* CA07 y *T. paratroviride* MA02 destacaron por presentar elevados valores de antagonismo potencial (89,88 % - 94,13 %) frente a *B. cinerea*. Estos resultados superan ampliamente el rango del 57,60 % al 78,64 % reportado para *T. afroharzianum*, *T. lentiforme*, *T. inhamatum*, *T. afarasin*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. spirale*, *T. asperelloides*, *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. CP24-6 frente a *M. roreri*

(Reyes-Figueroa *et al.*, 2016; Leiva *et al.*, 2020; Leiva *et al.*, 2022). En contraste, los aislamientos menos efectivos de nuestro estudio; *T. longibrachiatum* AZEN14, AZEN17, PA06 y CA01, así como *Trichoderma* sp. AZEN06 y T15; presentaron valores promedio de antagonismo potencial de 53,39 % y 62,06 %, respectivamente. No obstante, estos valores superan los promedios de 32,23 % y 23,14 % reportados para *T. longibrachiatum* frente a *M. roleri* (Reyes-Figueroa *et al.*, 2016; Leiva *et al.*, 2022).

Los metabolitos volátiles (MVs) producidos por las cepas de *Trichoderma* evaluadas en este estudio demostraron un fuerte efecto inhibitorio frente a *B. cinerea*, con porcentajes de inhibición que oscilaron entre 97,01 % y 78,52 % *in vitro* y entre 75,43 % y 44,55 % *in vivo*. Las cepas *Trichoderma* sp. AZEN06 y T15 presentaron los promedios de inhibición más elevados del 96,12 % *in vitro* y 74,87 % *in vivo*. Estos porcentajes de inhibición concuerdan con los reportados en otros estudios sobre *Trichoderma* endófito. Khruengsai *et al.* (2021) informaron que los MVs de *T. afroharzianum*, aislado de hojas de *Schefflera leucantha*, inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* en un 94,67 % y redujeron la severidad de la enfermedad en chiles frescos al 13,24 % (inhibición equivalente a 86,76 %). Phoka *et al.* (2020) y Rajani *et al.* (2021) reportaron que *T. asperelloides* PSU-P1 y *T. longibrachiatum* JL_5 alcanzaron inhibiciones *in vitro* del 84,95 % y 51,00 % frente a *Ganoderma* sp. y *Sclerotinia sclerotiorum*, respectivamente. Por su parte, Vidal *et al.* (2024) reportaron que los MVs de *Naganishia* sp., aislado de

Echinopsis chiloensis, inhibieron *in vitro* el crecimiento de *B. cinerea* en un 47,67 %, y en condiciones *in vivo* redujeron la severidad de la infección causada por el mismo fitopatógeno en bayas de uva a 43,1 % (inhibición equivalente a 57,9 %) y en tomate al 64,7 % (inhibición equivalente a 35,3 %); mientras que Intana *et al.* (2021) reportaron que *T. asperellum* T76-14 disminuyó en 10 mm el tamaño de la lesión producida por *Fusarium incarnatum* en frutos de melón, equivalente a una inhibición del 66,67 % respecto al control. La eficacia de nuestras dos cepas endófitas podría explicarse por su capacidad de colonizar nichos ecológicos similares a los de los fitopatógenos (raíces, tallos, hojas, frutos y semillas) (Chebotar *et al.*, 2015; Santoyo *et al.*, 2016; Bolívar-Anillo *et al.*, 2018), así como por la producción de MVs con actividad antifúngica dependiente de su perfil metabólico (Guo *et al.*, 2020; Chávez *et al.*, 2024). Respecto a los demás aislamientos rizosféricos, mostraron valores de inhibición que oscilaron entre 85,91 % y 78,52 % *in vitro*, y entre 49,80 % y 44,55 % *in vivo*, correspondientes a *T. paratroviride* MA02, *T. afroharzianum* AZEN10 y AZEN20, *T. asperelloides* CA07, y *T. longibrachiatum* AZEN17, PA06, CA01 y AZEN14 frente a *B. cinerea*. Estos resultados son similares a los reportados en otros estudios, donde se encontraron valores de inhibición *in vitro* que oscilaron entre 100 % y el 54,4 %, para las cepas *T. koningii* 27, *T. harzianum*, *T. koningiopsis* T-51, *T. harzianum* H22 y KNU1, *T. atroviride* 24, *Trichoderma pleuroticola* P22 y *T. asperellum* 18, frente a *B. cinerea* (Boualem *et al.*, 2015; Joo & Hussein, 2022; You *et al.*, 2022); mientras

que *Trichoderma album*-2 inhibió un 50,38 % frente a *Botrytis fabae* (Barakat et al., 2014). Asimismo, en evaluaciones *in vivo*, las cepas *T. koningiopsis* T-51 y *T. atroviride* IC-11 lograron reducir la incidencia de la enfermedad hasta un 26,0 % (inhibición equivalente a 74 %) en tomate y un 17 % (inhibición equivalente a 83 %) en bayas de arándanos (Bello et al., 2022; You et al., 2022). Por su parte, Zhang et al. (2025) reportaron que *T. asperellum* XY101 alcanzó una tasa de inhibición del 78,96 % en ramitas de peral infectadas con *Valsa pyri*, agente causal del cancro de *Valsa* del peral. La eficacia de los MVs de nuestros aislados también coincide con la reportada frente a otros fitopatógenos en ensayos *in vitro*, a saber, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis* y *T. atroviride* lograron inhibir el crecimiento en un 66,29 %, 61,31 %, 54,47 % y 45,77 % frente a *Alternaria alternata*, *Corynespora cassiicola*, *F. oxysporum* y *Sclerotinia asari*, respectivamente (Wonglom et al., 2020; Rao et al., 2022; Wang et al., 2022; Phillip et al., 2024). Esta alta eficacia de nuestras cepas es debida a que secretan una amplia gama de MVs, que son altamente inhibidores contra fitopatógenos. Por ejemplo, *T. harzianum*, *T. afroharzianum*, *T. atroviride* y *T. gamsii* secretan terpenos como gamma-cadineno, allo-aromadendreno, (+)-calareno, geranilacetona, longifoleno, alfa-selineno, beta-felandreno y cedrol; compuestos aromáticos y furánicos como 2,4-dimetilfurano, 2-pentilfurano, dibenzofurano, *p*-cimeno y creosol; aldehídos como acetaldehído, formaldehído, hexenal y decanal; alcoholes como etanol, metanol y alcohol feniletílico; pironas como 6-pentil-2H-piran-2-ona

(6-PP); cetonas como 3-metilacetofenona y 1-octen-3-ona; ácidos orgánicos como el ácido *n*-hexadecanoico y el ácido hexanodioico; y organosulfurados como disulfuro de dimetilo, cuyas actividades en sinergia demostraron inhibir el crecimiento de *B. cinerea*, *A. alternata*, *Plasmopara viticola*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum* (Chen *et al.*, 2016; Khruengsai *et al.*, 2021; Lazazzara *et al.*, 2021; Joo & Hussein, 2022; Rao *et al.*, 2022; Rubio *et al.*, 2022; Philip *et al.*, 2024). Por su parte, *T. longibrachiatum* produce longifoleno, cariofileno, cedreno y cupreneno, compuestos terpénicos que han sido relacionados con la inhibición de *Macrophomina phaseolina* (Sridharan *et al.*, 2020). Asimismo, *T. asperellum* y *T. asperelloides* producen una mezcla de MVs tales como 6-PP, metanotiol, 2-etil-1-hexanol, 1-octen-3-ol, 1-nonanol y nonanal, con potencial antifúngico frente a *Colletotrichum acutatum*, *Ganoderma* sp. y *A. alternata* (Phoka *et al.*, 2020; Wonglom *et al.*, 2020; Chávez-Aviles *et al.*, 2024; Shemshura *et al.*, 2024). Curiosamente, nuestras cepas de *Trichoderma* mostraron una elevada eficacia de inhibición frente a *B. cinerea* en condiciones *in vitro*, la cual se vio disminuida en el ensayo *in vivo*. Esto podría deberse a la complejidad del entorno *in vivo*, donde *B. cinerea* coloniza la baya de uva a través de grietas o mediante la asimilación de nutrientes en su superficie, lo que favorece su crecimiento y penetración en los tejidos internos (Williamson *et al.*, 2007; Herzog *et al.*, 2022). En ese contexto, el hongo se desarrolla dentro del fruto, donde los MVs pierden gran parte de su efectividad, ya que su acción es principalmente superficial y aérea, y no logran

difundirse adecuadamente en el interior. Por ello, *B. cinerea* se encuentra física y químicamente protegido de la atmósfera rica en MVs, lo que podría haber reducido la eficacia de nuestras cepas.

Respecto a los metabolitos no volátiles (MNVs), la inhibición aumentó a medida que lo hacía la concentración de los metabolitos (30 %, 40 %, 50 %) (Tabla 12, Figura 22b; Tabla 14, Figura 23b; Tabla 16, Figura 24b). En las evaluaciones in vitro, *T. afroharzianum* AZEN20 al 50 % presentó una inhibición del 80,81 %, seguido de *T. afroharzianum* AZEN10 con un 80,12 %, frente a *B. cinerea*. Estos valores superan ampliamente el 62,6 % reportado por Khairy *et al.* (2025) con metabolitos de *T. reesei* T1 al 50 %, y el 58,8 – 100 % obtenido por Raut *et al.* (2014) con MNVs de *T. harzianum* T36 y T50 frente a *F. graminearum*, *R. solani* y *Pythium ultimum*. Marques *et al.* (2018) documentaron un 75,69 % de inhibición de *S. sclerotiorum* por *T. harzianum* CEN1242 y CEN1255, y un 100 % contra *Cylindrocladium* sp.; Safari Motlagh *et al.* (2022) alcanzaron un 91,8 % con MNVs de *T. viride* al 25 %; y Nagamani *et al.* (2017) reportaron hasta un 93,3 % contra *S. rolfsii* con *T. asperellum* ATPU 6. Begum *et al.* (2018) informaron inhibiciones de entre 73 % y 82 % contra *P. ultimum*, *Aspergillus flavus* y *Rhizopus stolonifer* con MNVs de *T. harzianum* a 200 µg/mL. De igual forma, Yogalakshmi *et al.* (2021) reportaron inhibiciones de hasta 77,77 % con *T. atroviride*, y Joshi *et al.* (2016), con *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*, obtuvieron hasta un 70,6 % de inhibición frente a *Colletotrichum falcatum*. En contraste, cepas de *T. longibrachiatum*

AZEN14, AZEN17, CA01 y PA06, y *Trichoderma* sp. AZEN06 y TI15, mostraron inhibiciones más bajas ($\leq 65,05$ %), similares al 22 % descrito por Sridharan *et al.* (2021) para *T. longibrachiatum* EF5 contra *M. phaseolina*; al 20 % contra *Colletotrichum musae* con MNVs de *T. piluliferum* al 10 % (da Costa *et al.*, 2021); y al 58,88 % frente a *A. alternata* por *T. afroharzianum* TRI07 (Philip *et al.*, 2024). Chóez-Guaranda *et al.* (2023) reportaron un 47,02 % de inhibición contra *Moniliophthora perniciosa* con *T. spirale* C10 a 10 $\mu\text{g/mL}$, y solo un 26 % contra *M. rozeri* a 1000 $\mu\text{g/mL}$; mientras que León-Ttacca *et al.* (2024) solo reportaron entre 17,3 % y 25 % de inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* con MNVs de *Trichoderma* sp. al 50 %.

La capacidad de los MNVs para suprimir la germinación de conidios *B. cinerea*, es fundamental para prevenir nuevas infecciones. En este estudio, *T. afroharzianum* AZEN20 alcanzó un 81,53 %, y *T. afroharzianum* AZEN10 un 79,94 % de inhibición a 50 %. Khairy *et al.* (2025) obtuvieron solo un 68,1 % con *T. reesei* T1 al 50 %; Nurbailis *et al.* (2019) documentaron un 72,21 % para *T. harzianum* y un 71,41 % para *T. koningii* al 10 % frente a *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*, respectivamente; y Rahman *et al.* (2011) lograron una inhibición total (100 %) de la germinación de *C. capsici* con 2000 mg/L de MNVs de *T. harzianum*. Yin *et al.* (2010) reportaron un 100 % de inhibición de conidios de *B. cinerea* con su extracto FBE a 48,7 mg/L.

La eficacia *in vivo* suele ser menor que *in vitro* debido a la degradación de los MNVs, las barreras cuticulares y la interacción con la microbiota. En nuestras pruebas en bayas de uva de mesa, *T. afroharzianum* AZEN20 y AZEN10 al 50 % lograron una reducción aproximada del 55 % en el crecimiento de *B. cinerea*. Khairy *et al.* (2025) reportaron una reducción de la incidencia de la enfermedad por *B. cinerea* de 85 % a 19,3 % (equivalente a una inhibición del 77,3 %), y Savas *et al.* (2021) obtuvieron un 86,54 % con *T. atroviride* EGE-K-71 y un 71,79 % con *T. harzianum* EGE-K-38 al 25 % frente al mismo fitopatógeno. En otros frutos, da Costa *et al.* (2021) lograron una reducción del 57 % en lesiones de banano con MNVs de *T. piluliferum* al 10 % (v/v), comparable al 56 % obtenido con imazalil. Adebesin *et al.* (2009) reportaron hasta un 100 % de protección contra *F. oxysporum* en banano con *T. asperellum* NG-T161 al 50 %; y Rauf *et al.* (2024) demostraron entre 47 % y 55 % de reducción en la severidad de *F. oxysporum* en guisante al 60 %, con resultados comparables a los de fungicidas comerciales. Hasnain *et al.* (2024) documentaron un 57,6 % de inhibición *in vivo* en *Pisum sativum* con una combinación de *T. viride* y *T. harzianum* a 500 ppm. Finalmente, De Zotti *et al.* (2020) mostraron más del 95 % de reducción del área infectada en hojas de frijol, un 70 % en hojas de vid, y una disminución del 45 % en la enfermedad de bayas de uva con péptidos de *Trichoderma* a 50 μ M frente a *B. cinerea*.

La variabilidad en la eficacia antifúngica observada entre cepas de *Trichoderma* puede explicarse por la diversidad y especificidad de sus MNVs. Estos

compuestos, como peptaiboles, sorbicillinoides, ácidos carboxílicos y terpenoides, son producidos en perfiles únicos según la especie, la cepa y las condiciones ambientales, lo que define su actividad biológica (McMullin *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2023). Por ejemplo, los peptaiboles de *T. atroviride* y *T. harzianum* alteran la permeabilidad de las membranas celulares de los fitopatógenos, generando efectos letales (Schuhmacher *et al.*, 2006). Este mecanismo puede explicar la alta inhibición observada en las cepas *T. afroharzianum* AZEN20 y AZEN10 frente a *B. cinerea*, posiblemente debido a su capacidad para sintetizar lipopéptidos o terpenoides bioactivos, como el camazuleno, un sesquiterpeno antimicrobiano producido por *T. asperellum* YNQJ1002 (Ji *et al.*, 2023), compuesto que podría estar ausente o presente en menor cantidad en cepas menos efectivas. Asimismo, otras clases de MNVs como los ácidos carboxílicos y los ésteres de ácidos grasos, han mostrado actividad inhibitoria contra *F. oxysporum* y *C. capsici*, lo que refuerza la noción de que estos compuestos son claves en la capacidad antagonista de *Trichoderma* (Mishra *et al.*, 2018). En este contexto, la producción de MNVs como las koningininas, sorbicilinas o lipopeptaiboles (McMullin *et al.*, 2017) también podría contribuir al efecto antifúngico diferencial entre cepas. Por otro lado, la menor eficacia observada en condiciones *in vivo* puede atribuirse a diversos factores fisiológicos y ambientales. Entre ellos destacan la posible degradación enzimática de los MNVs por parte del hospedero, así como la presencia de barreras físicas en los tejidos vegetales que limitan la difusión de los metabolitos activos. Estas

limitaciones han sido documentadas, por ejemplo, en estudios con péptidos derivados de *Trichoderma*, que muestran disminución de actividad en matrices biológicas complejas (De Zotti *et al.*, 2020). Más allá del control fitosanitario, algunos MNVs presentan efectos positivos en la fisiología vegetal. Un caso destacado es el del ácido antranílico, producido por *T. guizhouense* NJAU4742, que estimula la formación de raíces laterales a través de la modulación de señales auxínicas y mecanismos redox asociados a especies reactivas de oxígeno (Chen *et al.*, 2024). Esto refleja el potencial dual de ciertos MNVs, no solo inhiben fitopatógenos, sino que también promueven el crecimiento y vigor de las plantas. En conjunto, los resultados se alinean con la premisa de que la capacidad biocontroladora y bioestimulante de *Trichoderma* depende críticamente de su arsenal metabólico, el cual está regulado a nivel genético y modulado por las interacciones ecológicas y ambientales (Gupta, 2020; Chen *et al.*, 2024).

En conclusión, los resultados de este estudio validan el uso de MVs y MNVs de *Trichoderma* spp. como una estrategia de manejo integrado de la podredumbre gris en uva de mesa. Las cepas *T. afroharzianum* AZEN10 y AZEN20, junto con *T. asperelloides* CA07 y *T. paratroviride* MA02, destacan por su elevado potencial antagónico (hasta 94,13 %) y su versatilidad ecológica, lo que las convierte en candidatas prometedoras para el desarrollo de formulaciones comerciales sostenibles.

VI. CONCLUSIONES

Se aislaron 118 cepas nativas de *Trichoderma* a partir de suelos rizosféricos de vid y tejidos de *Origanum vulgare* y *Azorella* sp., así como cepas de *Botrytis cinerea* desde racimos de uva infectados. La identificación, basada en enfoques morfológicos y filogenéticos multilocus (ITS, *tefl*, *rpb2*), reveló la presencia de *Trichoderma afroharzianum* AZEN20 y AZEN10, *T. longibrachiatum* CA01, PA06, AZEN14 y AZEN17, *T. paratroviride* MA02, *T. asperelloides* CA07 y *Trichoderma* sp. TI15 y AZEN06, esta última posible especie críptica del clado *Viridescens*. Para *B. cinerea* BO01, BO02 y BO03, el análisis de *g3pdh*, *hsp60* y *rpb2* confirmó su presencia en los racimos de vid muestreados.

Los resultados experimentales confirmaron que las cepas *T. afroharzianum* AZEN10 y AZEN20, así como *T. longibrachiatum* AZEN14 y AZEN17, presentan una alta capacidad antagónica frente a *B. cinerea* BO01 mediante antibiosis, con inhibiciones superiores al 87%. Por su parte, *T. asperelloides* CA07, *T. paratroviride* MA02 y *T. afroharzianum* AZEN10 y AZEN20 lograron un 100% de micoparasitismo, confirmando su eficacia como agentes de biocontrol.

Se identificó un amplio rango de eficacia antifúngica entre las cepas evaluadas, con valores de antagonismo potencial entre 50,61% y 94,13%. Las cepas líderes; *T. afroharzianum* AZEN20 y AZEN10, *T. asperelloides* CA07 y *T.*

paratroviride MA02; confirmaron una eficacia sobresaliente (> 89 %), con diferencias significativas respecto a otras cepas menos efectivas.

Los metabolitos extracelulares, tanto volátiles (MVs) como no volátiles (MNVs), demostraron una eficacia antifúngica significativa. Los MVs de *Trichoderma* sp. AZEN06 y TI15 lograron inhibiciones *in vitro* de hasta un 97,01 %, y en condiciones *in vivo*, de hasta un 75,43 %. En los ensayos *in vitro*, los MNVs mostraron una eficacia antifúngica dependiente de la concentración; *T. afroharzianum* AZEN20 y AZEN10 alcanzaron hasta un 80,81 % de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* a una concentración del 50 %, en placas enmendadas con dichos metabolitos. Asimismo, se observó un 80,81 % de inhibición en la germinación de conidios de *B. cinerea*, lo que posiciona a estas cepas como candidatas viables por su elevada eficacia. Por otra parte, en los ensayos *in vivo*, se redujo significativamente la infección en bayas de uva de mesa, con una inhibición del 55,18 %, lo que evidencia el potencial biocontrolador de sus metabolitos frente a *B. cinerea*.

VII. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar ensayos complementarios en condiciones de campo, en distintas etapas fenológicas del cultivo de uva de mesa, a fin de evaluar la eficacia de los metabolitos de *Trichoderma* spp. en situaciones ambientales más variables.

Se recomienda incorporar herramientas de secuenciación de nueva generación (NGS) para una caracterización más profunda de los perfiles genéticos y metabólicos de cepas de *Trichoderma* spp. con alto potencial, lo que podría revelar rutas biosintéticas involucradas y facilitar procesos biotecnológicos.

Es fundamental realizar estudios químicos detallados para identificar los compuestos específicos presentes en los metabolitos volátiles y no volátiles de *Trichoderma* spp. mediante técnicas como GC-MS o LC-MS. Esta caracterización permitirá correlacionar estructuras químicas con actividad antifúngica, optimizar su uso biotecnológico y facilitar el desarrollo de formulaciones comerciales estandarizadas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adebesin, A. A., Odebode, C. A., & Ayodele, A. M. (2009). Control of postharvest rots of banana fruits by conidia and culture filtrates of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Plant Protection Research*, 49(3), 302–308. <https://doi.org/10.2478/v10045-009-0049-6>
- Adrian, M., Corio-Coset, M., Calonnec, A., Cluzet, S., Poinssot, B., Trouvelot, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., & Viaud, M. (2024). Grapevine defence mechanisms when challenged by pathogenic fungi and oomycetes. In G. Bécard (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 110, pp. 101–195). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2024.04.004>
- Agudelo-Romero, P., Erban, A., Rego, C., Carbonell-Bejerano, P., Nascimento, T., Sousa, L., Martínez-Zapater, J. M., Kopka, J., & Fortes, A. M. (2015). Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1769–1785. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru517>
- Ahluwalia, V., Kumar, J., Rana, V. S., Sati, O. P., & Walia, S. (2015). Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity. *Natural Product Research*, 29(10), 914–920. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.958739>

- Alfizar, A., Marlina, M., & Susanti, F. (2013). Kemampuan antagonis *Trichoderma* sp. terhadap beberapa jamur patogen *in vitro*. *Jurnal Floratek*, 8(1), 45–51.
<http://www.jurnal.unsyiah.ac.id/floratek/article/download/860/799>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Álvarez-García, S., Mayo-Prieto, S., Gutiérrez, S., & Casquero, P. A. (2020). Self-inhibitory activity of *Trichoderma* soluble metabolites and their antifungal effects on *Fusarium oxysporum*. *Journal of Fungi*, 6(3), 176.
<https://doi.org/10.3390/jof6030176>
- Andrés, P., Alejandra, P., Benedicto, M., Nahuel, R., & Clara, B. (2022). A comparative study of different strains of *Trichoderma* under different conditions of temperature and pH for the control of *Rhizoctonia solani*. *Agricultural Sciences*, 13(6), 702–714.
<https://doi.org/10.4236/as.2022.136046>
- Asghar, W., Craven, K. D., Kataoka, R., Mahmood, A., Asghar, N., Raza, T., & Iftikhar, F. (2024). The application of *Trichoderma* spp., an old but new useful fungus, in sustainable soil health intensification: A comprehensive strategy for addressing challenges. *Plant Stress*, 12, 100455.
<https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100455>

- Asis, A., Shahriar, S. A., Naher, L., Saallah, S., Fatihah, H. N. N., Kumar, V., & Siddiquee, S. (2021). Identification patterns of *Trichoderma* strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. *Molecular Biology Reports*, 48(4), 3285–3301. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06321-0>
- Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics*, 14, 121. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-121>
- Athinuwat, D., Ruangwong, O.-U., Harishchandra, D. L., Pitija, K., & Sunpapao, A. (2024). Biological Control Activities of Rhizosphere Fungus *Trichoderma virens* T1-02 in Suppressing Flower Blight of Flamingo Flower (*Anthurium andraeanum* Lind.). *Journal of Fungi*, 10(1), 66. <https://doi.org/10.3390/jof10010066>
- Ayele, T. M., Gebremariam, G. D., & Patharajan, S. (2021). Isolation, identification and in vitro test for the biocontrol potential of *Trichoderma viride* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *The Open Agriculture Journal*, 15, 10–20. <https://doi.org/10.2174/1874331502115010010>
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., Vinyard, B. T., & Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological

control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46(1), 24–35.

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>

Barakat, F., Abada, K., Abou-Zeid, N., & El-Gammal, Y. (2014). Effect of Volatile and Non-Volatile Compounds of *Trichoderma* spp. on *Botrytis fabae*, the Causative Agent of Faba Bean Chocolate Spot. *American Journal of Life Sciences*, 2(6-2), 11–18. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.s.2014020602.12>

Begum, S., Iqbal, M., Iqbal, Z., Shah, H. U., & Numan, M. (2018). Assessment of mycelia extract from *Trichoderma harzianum* for its antifungal, insecticidal and phytotoxic importance. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 6(1), 209. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000209>

Bello, F., Montironi, I. D., Medina, M. B., Munitz, M. S., Ferreira, F. V., Williman, C., Vázquez, D., Cariddi, L. N., & Musumeci, M. A. (2022). Mycofumigation of postharvest blueberries with volatile compounds from *Trichoderma atroviride* IC-11 is a promising tool to control rots caused by *Botrytis cinerea*. *Food Microbiology*, 106, 104040. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104040>

Bendahmane, B., Mahiout, D., Benzhora, I., & Benkada, M. (2012). Antagonism of three *Trichoderma* species against *Botrytis fabae* and *B. cinerea*, the causal agents of chocolate spot of faba bean (*Vicia faba* L.) in Algeria. *World Applied Sciences Journal*, 17(3), 278–283. <https://www.researchgate.net/publication/351588801>

- Benhamou, N., & Chet, I. (1993). Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology*, 83(10), 1062–1071. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-1062>
- Benhamou, N., & Chet, I. (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*, 86(4), 405–416. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-405>
- Bhardwaj, N. R., & Kumar, J. (2017). Characterization of volatile secondary metabolites from *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied and Natural Science*, 9(2), 954–959. <https://doi.org/10.31018/jans.v9i2.1303>
- Bisset, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69, 2357–2372. <https://doi.org/10.1139/b91-297>
- Bisset, J. (1984). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62(5), 924–931. <https://doi.org/10.1139/b84-131>
- Bolívar-Anillo, H., Garrido, C., & Collado, I. (2019). Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry Reviews*, 19, 721–740. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09603-5>

- Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G., & Montesinos, E. (2022). Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases, *Microorganisms*, *10*(9), 1759. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091759>
- Boualem, B., Mohamed, B., & Moulay, B. (2015). Salinity Influence upon Activity of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*. *Asian Journal of Plant Pathology*, *9*(4), 158–166. <https://doi.org/10.3923/ajppaj.2015.158.166>
- Boukaew, S., Chumkaew, K., Petlamul, W., Srinuanpan, S., Nooprom, K., & Zhang, Z. (2024). Biocontrol effectiveness of *Trichoderma asperelloides* SKRU-01 and *Trichoderma asperellum* NST-009 on postharvest anthracnose in chili pepper. *Food Control*, *163*, 110490. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110490>
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Tohge, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A., & Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS pathogens*, *9*(3), e1003221. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003221>
- Bustamante, D. E., Calderon, M. S., Leiva, S., Mendoza, J. E., Arce, M., & Oliva, M. (2021). Three new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* and *Longibrachiatum* lineages from Peruvian cacao crop soils based on an

integrative approach. *Mycologia*, *113*(5), 1056–1072.

<https://doi.org/10.1080/00275514.2021.1917243>

Bustamante, M. I., Elfar, K., & Eskalen, A. (2022). Evaluation of the antifungal activity of endophytic and rhizospheric bacteria against grapevine trunk pathogens. *Microorganisms*, *10*(10), 2035.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10102035>

Cai, F., & Druzhinina, I. S. (2021). In honor of John Bissett: Authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity*, *107*, 1–69. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4>

Calvo-Garrido, C., Usall, J., Viñas, I., Elmer, P. A., Cases, E., & Teixidó, N. (2014). Potential secondary inoculum sources of *Botrytis cinerea* and their influence on bunch rot development in dry Mediterranean climate vineyards. *Pest management science*, *70*(6), 922–930. <https://doi.org/10.1002/ps.3629>

Carbone, I. & Kohn, L. (1999), A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, *91*, 553.

<https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>

Carro-Huerga, G., Compant, S., Gorfer, M., Cardoza, R. E., Schmoll, M., Gutiérrez, S., & Casquero, P. A. (2020). Colonization of *Vitis vinifera* L. by the Endophyte *Trichoderma* sp. Strain T154: Biocontrol Activity Against *Phaeoacremonium minimum*. *Frontiers in plant science*, *11*, 1170.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01170>

- Castillo Sandoval, O., Cruz Tangoa, W. A., Flores Palacios, P., Saavedra Navarro, Y., & Chuquihuanca Yacsahuanca, N. (2024), Evaluación de la eficiencia productiva del cultivo de la vid en la región Piura 2018–2023, *Revista De Investigación Científica De La UNF – Aypate*, 2(4), 73–80, <https://doi.org/10.57063/ricay,v2i4,70>
- Centro de Investigación de Economía y Negocios Internacionales (CIEN-ADEX). (2024). *Nota de inteligencia comercial: Perú: Evolución de la campaña de exportación de uvas (Campaña 2023/2024)*. Asociación de Exportadores (ADEX). https://www.cien.adexperu.org.pe/wp-content/uploads/2024/05/CIEN_NSIM1_Mayo_Uvas-Frescas.pdf
- Chalfoun, S. M. (2010). Biological control and bioactive microbial metabolites: A coffee quality perspective. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(5). <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000500001>
- Chaverri, P., & Samuels, G. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology*, 48(1), 1–36. <https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim48/part1.pdf>
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558–590. <https://doi.org/10.3852/14-147>

- Chávez-Avilés, M., García-Álvarez, M., Ávila-Oviedo, J., Hernández-Hernández, I., Bautista-Ortega, P., & Macías-Rodríguez, L. (2024). Volatile Organic Compounds Produced by *Trichoderma asperellum* with Antifungal Properties against *Colletotrichum acutatum*. *Microorganisms*, *12*(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102007>
- Chebotar, V., Malfanova, N., Shcherbakov, A., Ahtemova, G., Borisov, A., Lugtenberg, B., & Tikhonovich, A. (2015). Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *51*(3), 271–277. <https://doi.org/10.1134/S0003683815030059>
- Chen, J., Sun, S., Miao, C., Wu, K., Chen, Y., Xu, L., Guan, H., & Zhao, L. (2016). Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: A promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, *40*(4), 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.09.006>
- Chen, S. C., Zhao, H. J., Wang, Z. H., et al. (2016). *Trichoderma harzianum*-induced resistance against *Fusarium oxysporum* involves regulation of nuclear DNA content, cell viability and cell cycle-related genes expression in cucumber roots. *European Journal of Plant Pathology*, *147*, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0978-7>

- Chen, Y., Fu, Y., Xia, Y., Miao, Y., Shao, J., Xuan, W., Liu, Y., Xun, W., Yan, Q., Shen, Q., & Zhang, R. (2024). Trichoderma-secreted anthranilic acid promotes lateral root development via auxin signaling and RBOHF-induced endodermal cell wall remodeling. *Cell reports*, *43*(4), 114030. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114030>
- Chet, I., Harman, G. E., & Baker, R. (1981). *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial ecology*, *7*(1), 29–38, <https://doi.org/10.1007/BF02010476>
- Chóez-Guaranda, I., Espinoza-Lozano, F., Reyes-Araujo, D., Romero, C., Manzano, P., Galarza, L., & Sosa, D. (2023). Chemical Characterization of *Trichoderma* spp. Extracts with Antifungal Activity against Cocoa Pathogens. *Molecules*, *28*(7), 3208. <https://doi.org/10.3390/molecules28073208>
- Ciliberti, N., Fermaud, M., Languasco, L., & Rossi, V. (2015). Influence of Fungal Strain, Temperature, and Wetness Duration on Infection of Grapevine Inflorescences and Young Berry Clusters by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, *105*(3), 325–333, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-14-0152-R>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites

in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology*, 92(4), fiw036, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>

Contreras-Cornejo, H. A., Schmoll, M., Esquivel-Ayala, B. A., González-Esquivel, C. E., Rocha-Ramírez, V., & Larsen, J. (2024). Mechanisms for plant growth promotion activated by *Trichoderma* in natural and managed terrestrial ecosystems. *Microbiological Research*, 281, 127621. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127621>

Cook, R. J. (1988). Biological control and holistic plant-health care in agricultura. *American Journal of Alternative Agriculture*, 3(2/3), 51–62, <https://www.jstor.org/stable/44503451>

Cubilla-Ríos, A. A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D. D., Romero-Rodríguez, M. C., Flores-Giubi, M. E., & Barúa-Chamorro, J. E. (2019). Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 63–77, <https://dx.doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>

Cubilla-Ríos, A., Flores Giubi, M. E., Barúa, J. E., & Romero Rodríguez, M. C. (2020). Evaluación de metodologías para el análisis de perfil de proteínas secretadas por aislados de *Trichoderma* spp. al medio de cultivo. *Investigaciones y Estudios-UNA*, 11(1), 47-51, <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8600102>

- da Costa, A. C., de Miranda, R. F., Costa, F. A., & Ulhoa, C. J. (2021). Potential of *Trichoderma piluliferum* as a biocontrol agent of *Colletotrichum musae* in banana fruits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *34*, 102028. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102028>
- da Silva Ripardo-Filho, H., Coca Ruíz, V., Suárez, I., Moraga, J., Aleu, J., & Collado, I. G. (2023). From genes to molecules, secondary metabolism in *Botrytis cinerea*: New insights into anamorphic and teleomorphic stages. *Plants*, *12*(3), 553, <https://doi.org/10.3390/plants12030553>
- Dangallo, B. P. S., Bagacay, J. F. E. V., Canto, C. M., Velo, J. C., & Calabon, M. S. (2025). Morpho-phylogenetic evidence for the first freshwater record of *Trichoderma protrudens* Samuels & P. Chaverri (Hypocreales, Sordariomycetes). *Check List*, *21*(1), 87–99. <https://doi.org/10.15560/21.1.87>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, *9*(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- De Simone, N., Pace, B., Grieco, F., Chimienti, M., Tyibilika, V., Santoro, V., Capozzi, V., Colelli, G., Spano, G., & Russo, P. (2020). *Botrytis cinerea* and table grapes: A review of the main physical, chemical, and bio-based control treatments in post-harvest. *Foods*, *9*(9), 1138. <https://doi.org/10.3390/foods9091138>

- De Zotti, M., Sella, L., Bolzonello, A., Gabbatore, L., Peggion, C., Bortolotto, A., Elmaghraby, I., Tundo, S., & Favaron, F. (2020). Targeted amino acid substitutions in a *Trichoderma* peptaibol confer activity against fungal plant pathogens and protect host tissues from *Botrytis cinerea* infection. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(20), 7521. <https://doi.org/10.3390/ijms21207521>
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, *13*(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I, Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, *57*(1), 25–39. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3)
- Dhingra, O. D., & Sinclair, J. B. (1995). *Basic plant pathology methods* (2a ed.). CRC Press, Inc.
- Di Marco, S., Metruccio, E. G., Moretti, S., Nocentini, M., Carella, G., Pacetti, A., Battiston, E., Osti, F., & Mugnai, L. (2022). Activity of *Trichoderma asperellum* strain ICC 012 and *Trichoderma gamsii* strain ICC 080 toward

- diseases of Esca complex and associated pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12, 813410. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.813410>
- Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C. K., Broadway, R. M., & Harman, G. E. (1993). Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology*, 83(3), 308–313. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-308>
- Dini, I., Marra, R., Cavallo, P., Pironti, A., Sepe, I., Troisi, J., Scala, G., Lombardi, P., & Vinale, F. (2021). *Trichoderma* strains and metabolites selectively increase the production of volatile organic compounds (VOCs) in olive trees. *Metabolites*, 11(4), 213. <https://doi.org/10.3390/metabo11040213>
- Doneche, B., & Pucheu-Plante, B. (2015). Influence de divers effecteurs sur le développement de *Botrytis cinerea* en milieu synthétique: Définition d'un cycle conidien. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 25(1), 21–30. <https://doi.org/10.5073/vitis.1986.25.21-30>
- Dou, K., Lu, Z., Wu, Q., Ni, M., Yu, C., Wang, M., Li, Y., Wang, X., Xie, H., Chen, J., & Zhang, C. (2020). MIST: a Multilocus Identification System for *Trichoderma*. *Applied and environmental microbiology*, 86(18), e01532-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01532-20>
- Droby, S., & Lichter, A. (2007). Post-harvest *Botrytis* infection: Etiology, development and management. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, &

- N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 349–367). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_19
- 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., & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature reviews. Microbiology*, *9*(10), 749–759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>
- Druzhinina, I., & Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *6*(2), 100–112. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0100>
- Dubey, S. C., Tripathi, A., Dureja, P., & Grover, A. (2011). Characterization of secondary metabolites and enzymes produced by *Trichoderma* species and their efficacy against plant pathogenic fungi. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, *81*(5), 455–461.
- Dwivedi, M., Singh, P., & Pandey, A. K. (2024). *Botrytis* fruit rot management: What have we achieved so far? *Food Microbiology*, *122*, 104564. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104564>
- Edgar, R. C. (2021). MUSCLE v5 enables improved estimates of phylogenetic tree confidence by ensemble bootstrapping. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.06.20.449169>

- Elad, Y. (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea*-incited diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 102(8), 719–732.
<https://doi.org/10.1007/BF01877146>
- Elad, Y., Chet, I., Baker, P., & Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfii*—Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73(1), 85–88.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-73-85>
- Elad, Y., Sadowsky, Z., & Chet, I. (1987). Scanning electron microscopical observations of early stages of interaction of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. *Transactions of the British Mycological Society*, 88(2), 259–263. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(87\)80223-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(87)80223-1)
- Elad, Y., Vivier, M., & Fillinger, S. (2016). Botrytis, the good, the bad and the ugly. In S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 1–15). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_1
- Esterio, M., Osorio-Navarro, C., Azócar, M., Copier, C., Rubilar, M., Pizarro, L., & 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>

- Esterio, M., Osorio-Navarro, C., Carreras, C., Azócar, M., Copier, C., Estrada, V., Rubilar, M., & 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>
- Evans, H. C., Holmes, K. A., & Thomas, S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, *2*(2), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0053-4>
- Ferron, P., & Deguine, J.-P. (2005). Crop protection, biological control, habitat management, and integrated farming: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *25*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1051/agro:2004050>
- Filizola, P. R. B., Luna, M. A. C., de Souza, A. F., Coelho, I. L., Laranjeira, D., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1108-y>
- Fillinger, S., Leroux, P., Auclair, C., Barreau, C., Al Hajj, C., & Debieu, D. (2008). Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(11), 3933–3940. <https://doi.org/10.1128/aac.00615-08>

- Foley, M., & Deacon, J. (1985). Isolation of *Pythium oligandrum* and other necrotrophic mycoparasites from soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 85(4), 631–639. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(85\)80257-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(85)80257-6)
- French, E., & Hebert, T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. https://books.google.com.pe/books/about/M%C3%A9todos_de_investigaci%C3%B3n_fitopatol%C3%B3gica.html?id=etdbQtSPTh8C&redir_esc=y
- Fujinawa, M. F., Pontes, N. de C., Borel, F. C., Halfeld-Vieira, B. de A., de Goes, A., & Morandi, M. A. B. (2020). Biological control of gray mold and *Myrothecium* leaf spot in begonias. *Crop Protection*, 133, 105138. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105138>
- Gao, K., Liu, X., Guo, R., Gao, B., & Zhu, T. (2002). Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on five plant pathogenic fungi. *Journal of Shandong Agricultural University*, 33(1), 37–42. <https://europepmc.org/article/CBA/369988>
- Geng, L., Fu, Y., Peng, X., Yang, Z., Zhang, M., Song, Z., Guo, N., Chen, S., Chen, J., Bai, B., Liu, A., & Ahammed, G. J. (2022). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Biological Control*, 174, 105019. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105019>

- Ghisalberti, E. L., & Sivasithamparam, K. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(11), 1011–1020. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90036-J](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90036-J)
- Gualtieri, L., Monti, M. M., Mele, F., Russo, A., Pedata, P. A., & Ruocco, M. (2022). Volatile organic compound (VOC) profiles of different *Trichoderma* species and their potential application. *Journal of Fungi*, 8(10), 989. <https://doi.org/10.3390/jof8100989>
- Guo, Y., Ghirardo, A., Weber, B., Schnitzler, J. P., Benz, J. P., & Rosenkranz, M. (2019). *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 891. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00891>
- Guo, Y., Jud, W., Ghirardo, A., Anritter, F., Benz, J., Schnitzler, J., & Rosenkranz, M. (2020). Sniffing fungi – phenotyping of volatile chemical diversity in *Trichoderma* species. *New Phytologist*, 227(1), 244–259. <https://doi.org/10.1111/nph.16530>
- Gupta, N. (2020). *Trichoderma* as biostimulant: Factors responsible for plant growth promotion. In C. Manoharachary, H. B. Singh, & A. Varma (Eds.), *Trichoderma: Agricultural applications and beyond* (Vol. 61, pp. 255–272). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54758-5_13

- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*, 7(4), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Haidar, R., Fermaud, M., Calvo-Garrido, C., Roudet, J., & Deschamps, A. (2016). Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(3), 301–322. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18079
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symposium Series* (Vol. 41, pp. 95–98). Oxford University Press.
- Hammad, M., Guillemette, T., Alem, M., Bastide, F., & Louanchi, M. (2021). First report of three species of *Trichoderma* isolated from the rhizosphere in Algeria and the high antagonistic effect of *Trichoderma brevicompactum* to control grey mould disease of tomato. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00423-4>
- Harman G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190–194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>
- Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (Eds.). (1998). *Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482295320>

- Hasnain, A., Atiq, M., Rajput, N. A., Nawaz, A., Ahmad, W., Akhtar, M., Adil, Z., Waseem, A., Ijaz, A., & Ullah, A. (2024). Biocidal function of *Trichoderma*-derived secondary metabolites against *Fusarium* wilt of pea. *Plant Protection*, 8(3), Article 5310. <https://doi.org/10.33804/pp.008.03.5310>
- Hatem, A., Yaderets, V., Karpova, N., Glagoleva, E., Ovchinnikov, A., Petrova, K., Shibaeva, A., & Dzhavakhiya, V. (2023). Inhibition of the growth of *Botrytis cinerea* by *Penicillium chrysogenum* VKM F-4876D combined with fludioxonil-, difenoconazole-, or tebuconazole-based fungicides. *Agronomy*, 13(10), 2602. <https://doi.org/10.3390/agronomy13102602>
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., & Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 1890–1898. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1890-1898.2000>
- Hernández, G., Ponce de la Cal, A., Louis, Y., Baró Robaina, Y., Coll, Y., Spengler, I., & Mirabal-Gallardo, Y. (2024). Identification of secondary metabolites by UHPLC-ESI-HRMS/MS in antifungal strain *Trichoderma harzianum* (LBAT-53). *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 10(8), 547. <https://doi.org/10.3390/jof10080547>
- Herrera-Défaz, M., Fuentealba, D., Dibona-Villanueva, L., Schwantes, D., Jiménez, B., Ipinza, B., Latorre, B., Valdés-Gómez, H., & Fermaud, M. (2023).

- Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grape berries in Chile: Use of registered biofungicides and a new chitosan-based fungicide. *Horticulturae*, 9(7), 746. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9070746>
- Herzog, K., Schwander, F., Kassemeyer, H., Bieler, E., Dürrenberger, M., Trapp, O., & Töpfer, R. (2022). Towards Sensor-Based Phenotyping of Physical Barriers of Grapes to Improve Resilience to *Botrytis* Bunch Rot. *Frontiers in Plant Science*. 12. 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.808365>
- Hill, G. N. (2014). Investigation of *botrytis* bunch rot in wine grapes: The disease cycle and symptom quantification (Thesis). University of Tasmania. <https://doi.org/10.25959/23237228.v1>
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Inbar, J., Menéndez, A. B., & Chet, I. (1996). Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology & Biochemistry*, 28(6), 757–763. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(96\)00010-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(96)00010-7)
- Intana, W., Kheawleng, S., & Sunpapao, A. (2021). *Trichoderma asperellum* T76-14 released volatile organic compounds against postharvest fruit rot in

- muskmelons (*Cucumis melo*) caused by *Fusarium incarnatum*. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(1), 46. <https://doi.org/10.3390/jof7010046>
- International Organisation of Vine and Wine (OIV). (2017). *Distribution of the world's grapevine varieties*. <https://www.oiv.int/public/medias/5888/en-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties.pdf>
- Isaias, C. O., Martins, I., Silva, J. B. T., Silva, J. P., & Mello, S. C. M. (2014). Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathologica*, 40(1), 34–41. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052014000100005>
- Ismaiel, A., Lakshman, D. K., Jambhulkar, P. P., & Roberts, D. P. (2024). *Trichoderma*: Population structure and genetic diversity of species with high potential for biocontrol and biofertilizer applications. *Applied Microbiology*, 4(2), 875–893. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4020060>
- Jaklitsch, W. M., & Voglmayr, H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology*, 80, 1–87. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001>
- Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Ismaiel, A., & Voglmayr, H. (2013). Disentangling the *Trichoderma viridescens* complex. *Persoonia*, 31, 112–146. <https://doi.org/10.3767/003158513X672234>

- Jaklitsch, W., Komon, M., Kubicek, C., & Druzhinina, I. (2005). *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycologia*, 97, 1365–1378. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1365>
- Jeleń, H., Błaszczyk, L., Chełkowski, J., Rogowicz, K., & Strakowska, J. (2014). Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycological Progress*, 13(3), 589–600. <https://doi.org/10.1007/s11557-013-0942-2>
- Ji, H., Yu, R., Liu, H., Zhang, H., Wang, X., Chen, J., & Li, Y. (2023). Metabolic Features of a Novel *Trichoderma asperellum* YNQJ1002 with Potent Antagonistic Activity against *Fusarium graminearum*. *Metabolites*, 13(11), 1144. <https://doi.org/10.3390/metabo13111144>
- Joo, J. H., & Hussein, K. A. (2022). Biological Control and Plant Growth Promotion Properties of Volatile Organic Compound-Producing Antagonistic *Trichoderma* spp. *Frontiers in plant science*, 13, 897668. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.897668>
- Joshi, D., Singh, P., Singh, A. K., Lal, R. J., & Tripathi, N. (2016). Antifungal potential of metabolites from *Trichoderma* sp. against *Colletotrichum falcatum* Went causing red rot of sugarcane. *Sugar Tech*, 18(5), 529–536. <https://doi.org/10.1007/s12355-015-0421-y>

- Khairy, A., Elattaapy, A. M., Yousef, S. A., Hamada, M. S., Amin, B. H., & Elsherbiny, E. A. (2025). Effective biocontrol of *Botrytis cinerea* by antifungal metabolites of *Trichoderma reesei* T1 for gray mold in postharvest tomato. *International Journal of Food Microbiology*, 436, 111203. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111203>
- Khan, R. A. A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B., & Li, Y. (2020). Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. *Microorganisms*, 8(6), 817. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>
- Khan, R. A. A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., & Xie, B. (2020). Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic bacteria and root-knot nematode. *Microorganisms*, 8(3), 401. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030401>
- Khruengsai, S., Pripdeevech, P., D'Souza, P., & Panuwet, P. (2021). Biofumigation activities of volatile compounds from two *Trichoderma afroharzianum* strains against *Fusarium* infections in fresh chilies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(14), 5861–5871. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11238>
- Kim, G. Y., Lee, G. J., Ha, M. G., Lee, T. H., & Lee, J. D. (2000). Intrageneric relationships of *Trichoderma* based on internal transcribed spacers and 5.8S

rDNA nucleotide sequences. *Mycobiology*, 28(1), 11–16.

<https://doi.org/10.1080/12298093.2000.12015716>

Kim, S. H., Lee, Y., Balaraju, K., & Jeon, Y. (2023). Evaluation of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma longibrachiatum* as biocontrol agents in controlling red pepper anthracnose in Korea. *Frontiers in plant science*, 14, 1201875. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1201875>

Knee, M., Sargent, J., & Osborne, D. (1977). Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany*, 28(2), 377–396.

<https://doi.org/10.1093/jxb/28.2.377>

Krauss, U., Bidwell, R., & Ince, J. (1998). Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of crown rot of banana. *Biological Control*, 13(2), 111–119.

<https://doi.org/10.1006/bcon.1998.0651>

Kubicek, C. P., Steindorff, A. S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., Cai, F., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, E. M., Kuo, A., Baroncelli, R., Sarrocco, S., Noronha, E. F., Vannacci, G., Shen, Q., Grigoriev, I. V., & Druzhinina, I. S. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC genomics*, 20(1), 485.

<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>

Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: A multigene approach. *Mycological Research*, 106(7), 757–767.

<https://doi.org/10.1017/S0953756202006172>

- Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., & Srivastava, R. C. (2011). Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. *Indian Journal of Microbiology*, 52(2), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0205-3>
- Langa-Lomba, N., González-García, V., Venturini-Crespo, M. E., Casanova-Gascón, J., Barriuso-Vargas, J. J., & Martín-Ramos, P. (2023). Comparison of the efficacy of *Trichoderma* and *Bacillus* strains and commercial biocontrol products against grapevine *Botryosphaeria* dieback pathogens. *Agronomy*, 13(2), 533. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020533>
- Latorre, B. A., Agosín, E., San Martín, R., & Vásquez, G. S. (1997). Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection*, 16(3), 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(96\)00102-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(96)00102-0)
- Latorre, B. A., Elfar, K., & Ferrada, E. E. (2015). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 42(3), 305–330. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202015000300001>
- Latorre, B. A., Rioja, M. E., & Lillo, C. (2002). Efecto de la temperatura en el desarrollo de la infección producida por *Botrytis cinerea* en flores y bayas de uva de mesa. *Ciencia e Investigación Agraria: Revista Latinoamericana de Ciencias de la Agricultura*, 29(3), 145–152. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2193162>

- Lazazzara, V., Vicelli, B., Bueschl, C., Parich, A., Pertot, I., Schuhmacher, R., & Perazzolli, M. (2021). *Trichoderma* spp. volatile organic compounds protect grapevine plants by activating defense-related processes against downy mildew. *Physiologia Plantarum*, *172*(4), 1950–1965. <https://doi.org/10.1111/ppl.13406>
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. W. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, *3*, 7. <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0025-7>
- Leguin, M., Smets, W., Vandenheuvel, D., Eilers, T., Muyschondt, B., Prinsen, E., Samson, R., & Lebeer, S. (2020). Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01619>
- Leiva, S., Oliva, M., Hernández, E., Chuquibala, B., Rubio, K., García, F., & Torres de la Cruz, M. (2020). Assessment of the potential of *Trichoderma* spp. strains native to Bagua (Amazonas, Peru) in the biocontrol of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*). *Agronomy*, *10*(9), 1376. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091376>
- Leiva, S., Rubio, K., Díaz-Valderrama, J. R., Granda-Santos, M., & Mattos, L. (2022). Phylogenetic affinity in the potential antagonism of *Trichoderma*

- spp. against *Moniliophthora roreri*. *Agronomy*, 12(9), 2052.
<https://doi.org/10.3390/agronomy12092052>
- Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S., & Gascuel, O. (2019). NGPhylogeny.fr: New generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Research*, 47 (W1), W260–W265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>
- Leon, B., Yactayo, R., Astete, A., Mattos, L., & Arestegui, J. (2022). Antibiosis and mycoparasitism of endophytic fungi on the causal agent of blueberry gray mold (*Botrytis cinerea*). *Bioagro*, 34(3), 209–222.
<https://doi.org/10.51372/bioagro343.1>
- León-Ttacca, B., Alca-Zavala, J., Rosas-Martínez, J., Robles-Perez, E., Zamudio-Eustaquio, P., & García-Díaz, L. (2024). Hongos endófitos asociados a *Vitis vinifera* con capacidad de antibiosis hacia *Botrytis cinerea*. *Agronomía Mesoamericana*, 35(1), 56193. <https://dx.doi.org/10.15517/am.2024.56193>
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., & Gredt, M. (1999). Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*, 18(10), 687–697.
[https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00074-5)
- Li, M. F., Li, G. H., & Zhang, K. Q. (2019). Non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. *Metabolites*, 9(3), 58.
<https://doi.org/10.3390/metabo9030058>

- Lisboa, B., Centeno, C., Kayser, L., Pfeifer, J., Radin, B., & Rota, A. (2007). Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. *Ciência Rural*, 37(5), 1377–1383. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000500006>
- Liu, H., Wang, S., Lang, B., Li, Y., Wang, X., & Chen, J. (2023). Fused expression of Sm1-Chit42 proteins for synergistic mycoparasitic response of *Trichoderma afroharzianum* on *Botrytis cinerea*. *Microbial cell factories*, 22(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02151-w>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- Liu, Y., Whelen, S., & Hall, B. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1799–1808. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>
- Louis, C., Girard, M., Kuhl, G., & Lopez-Ferber, M. (1996). Persistence of *Botrytis cinerea* in its vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology*, 86(9), 934–939. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-934>

- Lumsden, R. D., Locke, J. C., Adkins, S. T., Walter, J. F., & Ridout, C. J. (1992). Isolation and localization of the antibiotic gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. *Phytopathology*, 82(2), 230–235. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Document/s/1992Abstracts/Phyto82_230.htm
- Maddison, W. P., & Maddison, D. R. (2023). *Mesquite: A modular system for evolutionary analysis* (Version 3.81). <http://www.mesquiteproject.org>
- Marik, T., Tyagi, C., Balázs, D., Urbán, P., Szepesi, Á., Bakacsy, L., Endre, G., Rakk, D., Szekeres, A., Andersson, M. A., Salonen, H., Druzhinina, I. S., Vágvölgyi, C., & Kredics, L. (2019). Structural Diversity and Bioactivities of Peptaibol Compounds From the Longibrachiatum Clade of the Filamentous Fungal Genus *Trichoderma*. *Frontiers in microbiology*, 10, 1434. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01434>
- Marques, E., Martins, I., & Marques, S. (2018). Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotropica*, 18(1). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0418>
- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H., & Cruz, A. (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Revista de Protección Vegetal*, 23(2), 118–125.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522008000200009

Martínez-Padrón, H. Y., Torres-Castillo, J. A., Rodríguez-Herrera, R., López-Santillán, J. A., Estrada-Drouaillet, B., & Osorio-Hernández, E. (2018). Identification and evaluation of secondary metabolites by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in native strains of *Trichoderma* species. *African Journal of Biotechnology*, *17*(37), 1162–1171. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16546>

McMullin, D. R., Renaud, J. B., Barasubiye, T., Sumarah, M. W., & Miller, J. D. (2017). Metabolites of *Trichoderma* species isolated from damp building materials. *Canadian journal of microbiology*, *63*(7), 621–632. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0083>

Menezes, J. P., Lupatini, M., Antonioli, Z. I., Blume, E., Junges, E., & Manzoni, C. G. (2010). Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Ciência e Agrotecnologia*, *34*(1), 132–139. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000100017>

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)* (pp. 1–8), New Orleans, LA, USA. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>

- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Mishra, A., Dixit, S., Ratan, V., Srivastava, M., Trivedi, S., & Srivastava, Y. K. (2018). Identification and in silico screening of biologically active secondary metabolites isolated from *Trichoderma harzianum*. *Annals of Phytomedicine*, 7(1), 78–86. <https://doi.org/10.21276/ap.2018.7.1.9>
- Mkhwanazi, G. J. M., Halleen, F., & Mostert, L. (2024). Fungicide sensitivity of *Trichoderma atroviride* and the application of this biocontrol fungus to protect grapevine sucker wounds. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 45(2), 66–74. <https://doi.org/10.21548/45-2-6464>
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., Clément, C., Mugnai, L., & Fontaine, F. (2018). Grapevine trunk diseases: A review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease*, 102(7), 1189–1217. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1181-FE>
- Montes Ninaquispe, J. C., Vasquez Huatay, K. C., Ludeña Jugo, D. A., Pantaleón Santa María, A. L., Farías Rodríguez, J. C., Suárez Santa Cruz, F., Escalona Aguilar, E. O., & Arbulú-Ballesteros, M. A. (2024). Market diversification

- and competitiveness of fresh grape exports in Peru. *Sustainability*, 16(6), 2528. <https://doi.org/10.3390/su16062528>
- Moya, P. A., Girotti, J. R., Toledo, A. V., & Sisterna, M. N. (2018). Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. *Journal of Plant Protection Research*, 58(1), 45–53. <https://doi.org/10.24425/119115>
- Moyano Cárdbaba, C. (2001). *Epidemiología y control integrado de Botrytis cinerea en invernaderos de Almería* [Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Madrid]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=185735>
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., & Kenerley, C. M. (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. *Microbiology*, 158(Pt 1), 35–45. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053629-0>
- Mukherjee, P. K., Mendoza-Mendoza, A., Zeilinger, S., & Horwitz, B. A. (2022). Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews*, 39, 15–33. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.004>
- Mukhopadhyay, R., & Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: A beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>

- Murray, R., Candan, A., & Vázquez, D. (2019). *Manual de poscosecha de frutas*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/PDA/documentos/manual_poscosecha_frutas_INTA.pdf
- Naegele, R. P. (2018). Evaluation of host resistance to *Botrytis* bunch rot in *Vitis* spp., and its correlation with *Botrytis* leaf spot. *HortScience*, 53(2), 204–207. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12655-17>
- Nagamani, P., Bhagat, S., Biswas, M. K., & Viswanath, K. (2017). Effect of volatile and non-volatile compounds of *Trichoderma* spp. against soil borne diseases of chickpea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(7), 1486–1491. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.177>
- Nawrocka, J., Szymczak, K., Maćkowiak, A., Skwarek-Fadecka, M., & Małolepsza, U. (2022). Determination of reactive oxygen or nitrogen species and novel volatile organic compounds in the defense responses of tomato plants against *Botrytis cinerea* induced by *Trichoderma virens* TRS 106. *Cells*, 11(19), 3051. <https://doi.org/10.3390/cells11193051>
- Neri, F., Mari, M., Brigati, S., & Bertolini, P. (2007). Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. *Plant Disease*, 91(1), 30–35. <https://doi.org/10.1094/PD-91-0030>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-

- likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Notte, A. M., Plaza, V., Marambio-Alvarado, B., Olivares-Urbina, L., Poblete-Morales, M., Silva-Moreno, E., & Castillo, L. (2021). Molecular identification and characterization of *Botrytis cinerea* associated with the endemic flora of semi-desert climate in Chile. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100049.
<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100049>
- Nurbailis, Djamaan, A., Rahma, H., & Liswarni, Y. (2019). Potential of culture filtrate from *Trichoderma* spp. as biofungicide to *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease in chili. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(10), artículo e201020.
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d201020>
- Odebode, A. C. (2006). Control of postharvest pathogens of fruits by culture filtrate from antagonistic fungi. *Journal of Plant Protection Research*, 46(1), 1–5.
<http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-article-4c970aa8-a6ab-4abd-bb95-58261f62d295>
- Ortuño, N., Miranda, C., & Claros, M. (2013). Selección de cepas de *Trichoderma* spp., generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 1(1), 16-32.

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592013000100003&lng=es&tlng=es

- Ospina-Giraldo, M. D., Royse, D. J., Chen, X., & Romaine, C. P. (1999). Molecular Phylogenetic Analyses of Biological Control Strains of *Trichoderma harzianum* and Other Biotypes of *Trichoderma* spp. Associated with Mushroom Green Mold. *Phytopathology*, 89(4), 308–313.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.4.308>
- Pacheco-Trejo, J., Aquino-Torres, E., Reyes-Santamaría, M. I., Islas-Pelcastre, M., Pérez-Ríos, S. R., Madariaga-Navarrete, A., & Saucedo-García, M. (2022). Plant defensive responses triggered by *Trichoderma* spp., as tools to face stressful conditions. *Horticulturae*, 8(12), 1181.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae8121181>
- Padmaja, M., Swathi, J., Narendra, K., Sowjanya, K. M., Babu, P. J., & Satya, A. K. (2013). *Trichoderma* sp., as a microbial antagonist against *Rhizoctonia solani*. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 4(3), 886–891.
- Palou, L., Smilanick, J., & Droby, S. (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue molds. *Stewart Postharvest Review*, 4(2), 1–16.
<https://doi.org/10.2212/spr.2008.2.2>

- Pandey, D., Tripathi, N., Tripathi, R., & Dixit, S. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 89(6), 344–349. <https://www.jstor.org/stable/43214961>
- Perek, A., & Świerczyńska, I. (2012). Influence of fungicides on antagonism of fungi *Trichoderma viride* and *Fusarium* spp., under in vitro conditions. *Progress in Plant Protection*, 52(4), 1038–1041. <https://doi.org/10.14199/PPP-2012-179>
- Petrasch, S., Knapp, S. J., van Kan, J. A. L., & Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 877–892. <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>
- Philip, B., Behiry, S. I., Salem, M. Z. M., Amer, M. A., El-Samra, I. A., Abdelkhalek, A., & Heflish, A. (2024). *Trichoderma afroharzianum* TRI07 metabolites inhibit *Alternaria alternata* growth and induce tomato defense-related enzymes. *Scientific Reports*, 14, 1874. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52301-2>
- Phoka, N., Suwannarach, N., Lumyong, S., Ito, S.-i., Matsui, K., Arikiti, S., & Sunpapao, A. (2020). Role of volatiles from the endophytic fungus *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 in biocontrol potential and in promoting

- the plant growth of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Fungi*, 6(4), 341.
<https://doi.org/10.3390/jof6040341>
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., & Gullino, M. L. (1997). Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 11(3), 131–140.
[https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(97\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(97)00022-7)
- Pollard-Flamand, J., Boulé, J., Hart, M., & Úrbez-Torres, J. R. (2022). Biocontrol activity of *Trichoderma* species isolated from grapevines in British Columbia against *Botryosphaeria* dieback fungal pathogens. *Journal of Fungi*, 8(4), 409. <https://doi.org/10.3390/jof8040409>
- Prasad, B. N., & Kumar, M. R. (2013). Scanning electron microscopic studies on mycoparasitic activity of *Trichoderma* spp., against *Rhizoctonia solani*, incitant of sheath blight of rice. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4(3), 88–96.
- Qin, G., Tian, S., & Xu, Y. (2004). Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 31(1), 51–58.
[https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00130-3)
- Rahman, M. A., Rahman, M. M., Azad, A. K., & Alam, M. F. (2011). Inhibitory effect of different plant extracts and antifungal metabolites of *Trichoderma* strains on the conidial germination and germ tube growth of *Colletotrichum*

capsici causing chili anthracnose. *International Journal of Agricultural and Agricultural Research (IJAAR)*, 1(1), 20-28. <https://innspub.net/inhibitory-effect-of-different-plant-extracts-and-antifungal-metabolites-of-trichoderma-strains-on-the-conidial-germination-and-germ-tube-growth-of-colletotrichum-capsici-causing-c/>

- Rajani, P., Rajasekaran, C., Vasanthakumari, M., Olsson, S., Ravikanth, G., & Shaanker, R. (2021). Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 242, 126595. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126595>
- Rambaut, A. (2010). Figtree (Version 1.4.4). Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Rao, Y., Zeng, L., Jiang, H., Mei, L., & Wang, Y. (2022). *Trichoderma atroviride* LZ42 releases volatile organic compounds promoting plant growth and suppressing *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings. *BMC Microbiology*, 22, 88. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02511-3>
- Rauf, A., Subhani, M. N., Siddique, M., Shahid, H., Chattha, M. B., Alrefaei, A. F., Hasan Naqvi, S. A., Ali, H., & Lucas, R. S. (2024). Cultivating a greener

future: Exploiting trichoderma derived secondary metabolites for fusarium wilt management in peas. *Heliyon*, 10(7), e29031. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29031>

Răut, I., Badea-Doni, M., Călin, M., Oancea, F., Vasilescu, G., Şesan, T. E., & Jecu, L. (2014). Effect of volatile and non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. against important phytopathogens. *Revista de Chimie*, 65(11), 1285–1288

Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., & Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89–123. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9032-2>

Resende, M. de L., Oliveira, J. A. de, Guimarães, R. M., Von Pinho, R. G., & Vieira, A. R. (2004). Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. *Ciência e Agrotecnologia*, 28(4), 848–852. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000400010>

Reyes Ramírez, A., Cristóbal Alejo, J., Ruiz Sánchez, E., & Tun Suárez, J. M. (2012). Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinense*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad (La Habana)*, 16(3), 161–165. <https://biblat.unam.mx/es/revista/fitosanidad-la-habana/articulo/inhibicion-del-crecimiento-in-vitro-de-fusarium-sp-aislado-de-chile-habanero-capsicum-chinensis-con-hongos-antagonistas>

- Reyes, Y., Martínez, B., & Infante, D. (2008). Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Revista de Protección Vegetal*, 23(2), 112–117. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522008000200008
- Reyes-Figueroa, O., Ortiz-García, C. F., Torres-de la Cruz, M., Lagunes-Espinoza, L. del C., & Valdovinos-Ponce, G. (2016). *Trichoderma* species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora roreri*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 22(2), 149–163. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.08.036>
- Rivas Santoyo, F. J., Jiménez, E., Sotelo Mundo, R. R., Islas Osuna, M. A., & Báez Sañudo, R. (2007). Pudrición de racimos de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) en postcosecha: Una amenaza latente en Sonora. En F. Artés Calero (Dir.), *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. Tecnología, calidad y seguridad hortofrutícola* (pp. 273–282). Universidad Politécnica de Cartagena. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8914276>
- Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. (2021). Mechanisms of action of microbial biocontrol agents against *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(12), 1045. <https://doi.org/10.3390/jof7121045>

- Rodríguez-Martínez, E. S., Rios-Velasco, C., Sepúlveda-Ahumada, D. R., Buenrostro-Figueroa, J. J., Correia, K. C., Guigón-López, C., & Alvarado-González, M. (2025). *Trichoderma* species from semiarid regions and their antagonism against the microorganisms that cause pepper wilt. *Journal of Fungi*, *11*(3), 174. <https://doi.org/10.3390/jof11030174>
- Romanazzi, G., Smilanick, J., Feliziani, E., & Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, *113*, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.003>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rubio, M., Monti, M., Gualtieri, L., Ruocco, M., Hermosa, R., & Monte, E. (2023). *Trichoderma harzianum* volatile organic compounds regulated by the THCTF1 transcription factor are involved in antifungal activity and beneficial plant responses. *Journal of Fungi*, *9*(6), 654. <https://doi.org/10.3390/jof9060654>
- Safari Motlagh, M. R., Farokhzad, M., Kaviani, B., & Kulus, D. (2022). Endophytic fungi as potential biocontrol agents against *Sclerotium rolfsii* Sacc.—The

causal agent of peanut white stem rot disease. *Cells*, *11*(17), 2643.

<https://doi.org/10.3390/cells11172643>

Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology.

Phytopathology, *96*(2), 195–206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0195>

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A., & Petrini, O. (2002).

Trichoderma species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, *94*(1), 146–170.

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B.-S., Petrini, O., Schroers, H.-J., & Druzhinina, I.

S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, *56*, 67–133. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03>

Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M. C., De Respinis, S., & Petrini, O. (2010).

Trichoderma asperellum sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, *102*(4), 944–966. <https://doi.org/10.3852/09-243>

Samuels, G. J., Ismaiel, A., Mulaw, T. B., Szakacs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek,

C. P., & Jaklitsch, W. M. (2012). The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal diversity*, *55*(1), 77–108.

<https://doi.org/10.1007/s13225-012-0152-2>

Sánchez-Montesinos, B., Santos, M., Moreno-Gavira, A., Marín-Rodulfo, T., Gea,

F. J., & Diáñez, F. (2021). Biological control of fungal diseases by *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* and its compatibility with

- fungicides. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(8), 598.
<https://doi.org/10.3390/jof7080598>
- Santos, H., Augusto, C., Reis, P., Rego, C., Figueiredo, A. C., & Fortes, A. M. (2022). Volatile metabolism of wine grape Trincadeira: Impact of infection with *Botrytis cinerea*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(1), 141.
<https://doi.org/10.3390/plants11010141>
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Saravanakumar, K., Lu, Z., Xia, H., Wang, M., Sun, J., Wang, S., Wang, Q., Li, Y., & Chen, L. (2018). Triggering the biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Trichoderma harzianum* through inhibition of pathogenicity and virulence related proteins. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 5(2), 271–279. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018214>
- Sarria, G., Garcia, A., Mestizo, Y., Medina, C., Varón, F., Mesa, E., & Hernandez, S. (2021). Antagonistic interactions between *Trichoderma* spp. and *Phytophthora palmivora* (Butler) from oil palm in Colombia. *European Journal of Plant Pathology*, 161(4), 751–768.
<https://doi.org/10.1007/s10658-021-02363-z>
- Sarro Baro, Á., Lara, J. M., & Fernández Castillo, C. (2011). Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* FEPP TL0601 frente a

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*. *Phytoma España: La Revista Profesional de Sanidad Vegetal*, 225, 47–50.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3767510>

Savas, N. G., Yıldız, M., Eltem, R., & Ozkale, E. (2021). Determination of antifungal efficiency of some fungicides and secondary metabolites of *Trichoderma* species against *Botrytis cinerea*. *Journal of Environmental Biology*, 42(3), 705–713. <https://doi.org/10.22438/jeb/42/3/MRN-1589>

Schuhmacher, R., Stoppacher, N., & Zeilinger, S. (2007). Peptaibols of *Trichoderma atroviride*: Screening, identification, and structure elucidation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (pp. 609–617). In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology* (Vol. 1). Formatex.
<http://www.formatex.org/microbio/>

Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martínez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S. E., & Kubicek, C. P. (2009). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics*, 10, 567. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-567>

Sempere, F., & Santamarina, M. P. (2007). *In vitro* biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions.

Mycopathologia, 163(3), 183–190. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-0101-x>

Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (2014). *Procedimiento: Certificación fitosanitaria de uva fresca (Vitis vinifera) destinada a la exportación* (Revisión 03). <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/12/Procedimiento-exportacion-uva.pdf>

Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (2025a). *Perú se consolida como líder mundial en la exportación de uva de mesa*. <https://www.gob.pe/institucion/senasa/noticias/1136994-peru-se-consolida-como-lider-mundial-en-la-exportacion-de-uva-de-mesa>

Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (2025b). *Perú combate plagas con uso de controladores biológicos en más de 209 mil hectáreas de cultivos*. <https://www.gob.pe/institucion/senasa/noticias/1155730-peru-combate-plagas-con-uso-de-controladores-biologicos-en-mas-de-209-mil-hectareas-de-cultivos>

Setargie, A., Wang, C., Zhang, L., & Xu, Y. (2023). Chromatographic and mass spectroscopic guided discovery of *Trichoderma* peptaibiotics and their bioactivity. *Engineering Microbiology*, 4(2), 100135. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2023.100135>

- Shahriar, S. A., Islam, M. N., Chun, C. N. W., Kaur, P., Rahim, M. A., Islam, M. M., Uddain, J., & Siddiquee, S. (2022). Microbial metabolomics interaction and ecological challenges of *Trichoderma* species as biocontrol inoculant in crop rhizosphere. *Agronomy*, 12(4), 900. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040900>
- Shaikh, F. T., & Sahera, N. (2012). Biocontrol efficacy of *Trichoderma koningii* against some plant pathogenic fungi. *Paripex - Indian Journal of Research*, 2(3), 9–10. <https://doi.org/10.15373/22501991/MAR2013/3>
- Shemshura, O., Shemsheeva, Z., Alimzhanova, M., Sadanov, M., Bozena, L., & Khalima, K. (2023). Antifungal activity of *Trichoderma asperellum* and a profile of its volatile organic compounds. *Pakistan Journal of Botany*, 56(3). [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2024-3\(9\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2024-3(9))
- Silva, G. da C., Kitano, I. T., Ribeiro, I. A. de F., & Lacava, P. T. (2022). The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture. *Frontiers in Soil Science*, 2, Article 833181. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.833181>
- Singh, R., Caseys, C., & Kliebenstein, D. J. (2024). Genetic and molecular landscapes of the generalist phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 25(1), e13404. <https://doi.org/10.1111/mpp.13404>
- Skidmore, A., & Dickinson, C. (1976). Interactions between germinating spores of *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British*

Mycological Society, 66(1), 45–56. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80091-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80091-5)

Soares, E. P. S., Azevedo, D. M. Q., Rodrigues, G. R., Frois, M. R., Silva, G. C. G. da, & Sales, N. L. P. (2011). Atividade antagonista de oito isolados de *Trichoderma* spp. a dois isolados de *Fusarium* sp., *in vitro*. *Cadernos de Agroecologia*, 6(2), Art. 10886.

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: The "Secrets" of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(6), 762. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>

Sridharan, A. P., Sugitha, T., Karthikeyan, G., Nakkeeran, S., & Sivakumar, U. (2021). Metabolites of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 inhibits soil borne pathogen, *Macrophomina phaseolina* by triggering amino sugar metabolism. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104714. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104714>

Sridharan, A., Thankappan, S., Karthikeyan, G. & Uthandi, S. (2020). Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Microbiological Research*, 236, 126436. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126436>

- Srivastava, D. A., Harris, R., Breuer, G., & Levy, M. (2021). Secretion-based modes of action of biocontrol agents with a focus on *Pseudozyma aphidis*. *Plants*, *10*(2), 210. <https://doi.org/10.3390/plants10020210>
- Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan, J. A. L. (2005). 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>
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., & Coronado, M. F. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, *16*, 509–516.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, *81*(2), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.011>
- Stracquadano, C., Quiles, J. M., Meca, G., & Cacciola, S. O. (2020). Antifungal activity of bioactive metabolites produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in liquid medium. *Journal of Fungi (Basel)*, *6*(4), 263. <https://doi.org/10.3390/jof6040263>
- Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J. L., Kannangara, S. D., & 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, 604923. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>
- Thompson, W. R. (1930). The principles of biological control. *Annals of Applied Biology*, 17, 306–338. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1930.tb07216.x>
- Torres-Rodriguez, J. A., Reyes-Pérez, J. J., Quiñones-Aguilar, E. E., & Hernandez-Montiel, L. G. (2022). Actinomycete potential as biocontrol agent of phytopathogenic fungi: Mechanisms, source, and applications. *Plants (Basel)*, 11(23), 3201. <https://doi.org/10.3390/plants11233201>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszek-Ścisielec, J. (2022). *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Vaidya, G., Lohman, D. J., & Meier, R. (2011). SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27(2), 171–180. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>
- Vajna, L. (1985). Mutual parasitism between *Trichoderma hamatum* and *Trichoderma pseudokoningii*. *Journal of Phytopathology*, 113(4), 300–303. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1985.tb04829.x>

- van Kan, J. A. L. (2005). Infection strategies of *Botrytis cinerea*. *Acta Horticulturae*, 669, 77–90. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.669.9>
- Větrovský, T., Kolařík, M., Žifčáková, L., Zelenka, T., & Baldrian, P. (2016). The *rpb2* gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular Ecology Resources*, 16(2), 388–401. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12456>
- Vidal, A., Castro, P., Navarro, F., Parada, R., Mendoza, L., & Cotoras, M. (2024). Effect of volatile compounds emitted by an endophytic yeast isolated from the endemic plant *Echinopsis chiloensis* against *Botrytis cinerea*. *Horticulturae*, 10(9), 1005. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10091005>
- Wang, H., Liu, M., Zhang, W., Yan, J., Tang, X., Sanchez-Molina, J. A., & Li, X. (2023). An effect and less spraying control method successfully controls *Botrytis cinerea* on grapes in China. *Agronomy*, 13(10), 2578. <https://doi.org/10.3390/agronomy13102578>
- Wang, Z., Wang, Z., Lu, B., Quan, X., Zhao, G., Zhang, Z., Liu, W., & Tian, Y. (2022). Antagonistic potential of *Trichoderma* as a biocontrol agent against *Sclerotinia asari*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 997050. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997050>
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22, 837–845.

- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky, & T. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Wirsel, S., Leibinger, W., Ernst, M., & Mendgen, K. (2001). Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. *New Phytologist*, 149, 589–598.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00038.x>
- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C., & Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39(4), 245–258.
[https://doi.org/10.1016/0885-5765\(91\)90003-G](https://doi.org/10.1016/0885-5765(91)90003-G)
- Wisniewski, M., Wilson, C., Droby, S., Chalutz, E., El Ghaouth, A., & Stevens, C. (2007). Postharvest biocontrol: New concepts and applications. In C. Vincent, M. S. Goettel, & G. Lazarovits (Eds.), *Biological control: A global perspective* (pp. 262–273). <https://doi.org/10.1079/9781845932657.0262>

- Woo, S. L., Hermosa, R., Lorito, M., & Monte, E. (2023). *Trichoderma*: A multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*, *21*(5), 312–326. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5>
- Wu, X., Lyu, Y., Ren, H., Zhou, F., Zhang, X., Zhao, X., Zhang, G., & Yang, H. (2022). Degradation of oxalic acid by *Trichoderma afroharzianum* and its correlation with cell wall degrading enzymes in antagonizing *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology*, *133*(5), 2680–2693. <https://doi.org/10.1111/jam.15617>
- Xing, S., Wang, M., Zhang, Z., Yuan, Y. Y., Song, Z., Wu, B., & Wei, J. (2024). Sulfur dioxide enhances postharvest grape resistance to *Botrytis cinerea* by promoting glutathione level. *Scientia Horticulturae*, *334*, 113295. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113295>
- Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in microbiology*, *14*, 1160551. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1160551>
- Ye, Q., Zhang, W., Jia, J., Li, X., Zhou, Y., Han, C., Wu, X., & Yan, J. (2021). Fungal pathogens associated with black foot of grapevine in China. *Phytopathologia Mediterranea*, *60*(2), 303–319. <https://doi.org/10.36253/phyto-12353>

- Yin, G., Wang, W., Sha, S., Liu, L., & Yu, X. (2010). Inhibition and control effects of the ethyl acetate extract of *Trichoderma harzianum* fermented broth against *Botrytis cinerea*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(15), 1647–1653.
- Yogalakshmi, S., Thiruvudainambi, S., Kalpana, K., Thamizh Vendan, R., & Oviya, R. (2021). Antifungal activity of *Trichoderma atroviride* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing wilt disease of tomato. *Journal of Horticultural Sciences*, 16(2), 241–250.
<https://doi.org/10.24154/jhs.v16i2.1066>
- You, J., Li, G., Li, C., Zhu, L., Yang, H., Song, R., & Gu, W. (2022). Biological control and plant growth promotion by volatile organic compounds of *Trichoderma koningiopsis* T-51. *Journal of Fungi*, 8(2), 131.
<https://doi.org/10.3390/jof8020131>
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30(2), 74–90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>
- Zhang, C., Li, T., Xiao, L., Zhang, W., Liu, X., Wang, M., & Zhang, H. (2020). Characterization of tebuconazole resistance in *Botrytis cinerea* from tomato plants in China. *Phytopathology Research*, 2(1), 25.
<https://doi.org/10.1186/s42483-020-00064-9>

- Zhang, H., Godana, E. A., Sui, Y., Yang, Q., Zhang, X., & Zhao, L. (2020). Biological control as an alternative to synthetic fungicides for the management of grey and blue mould diseases of table grapes: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(4), 450–462. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1794793>
- Zhang, Y., Wu, L., Lu, Y., Li, B., Jin, Z., Wang, J., Bai, R., Wu, Q., Fan, Q., Tang, J. H., Yin, F., & He, Y. (2025). Biocontrol activity and antifungal mechanisms of volatile organic compounds produced by *Trichoderma asperellum* XY101 against pear *Valsa* canker. *Pest Management Science*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/ps.8837>
- Zheng, H., Qiao, M., Lv, Y., Du, X., Zhang, K.-Q., & Yu, Z. (2021). New species of *Trichoderma* isolated as endophytes and saprobes from Southwest China. *Journal of Fungi*, 7(6), 467. <https://doi.org/10.3390/jof7060467>

IX. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* BO01 por cepas de *Trichoderma* en ensayo de antibiosis.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Cepa	9	1521,50	169,06	15,34	0,000
Error	20	220,40	11,02		
Total	29	1741,90			

Coefficiente de variación (C. V.) = 9,58 %

Anexo 2. Análisis de varianza para el porcentaje de micoparasitismo de *Trichoderma* frente a *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Cepa	9	71060	7895,60	22,26	0,000
Error	50	17733	354,70		
Total	59	88793			

C. V. = 14,30 %

Anexo 3. Análisis de varianza para el porcentaje de antagonismo potencial de cepas de *Trichoderma* frente a *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Cepa	9	10263,80	1140,42	29,65	0,000
Error	20	769,30	38,47		
Total	29	11033,10			

C. V. = 17,63 %

Anexo 4. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vitro de metabolitos volátiles de cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Cepa	9	2185	242,82	2,69	0,012
Error	50	4509	90,18		
Total	59	6694			

C. V. = 12,57 %

Anexo 5. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vivo de metabolitos volátiles de cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor <i>p</i> (0,05)
Cepa	9	5345,10	593,90	18,99	0,000
Error	30	938,10	31,27		
Total	39	6283,10			

C. V. = 24,43 %

Anexo 6. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vitro de los MNVs (30 %) de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor <i>p</i> (0,05)
Cepa	9	8521,60	946,85	81,50	0,000
Error	20	232,30	11,62		
Total	29	8754,00			

C. V. = 19,12 %

Anexo 7. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vitro de los MNVs (40 %) de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Cepa	9	7818,50	868,73	30,53	0,000
Error	20	569,10	28,45		
Total	29	8387,60			

C. V. = 19,68 %

Anexo 8. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vitro de los MNVs (50 %) de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Cepa	9	2681,10	297,90	10,84	0,000
Error	20	549,70	27,48		
Total	29	3230,80			

C. V. = 16,32 %

Anexo 9. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vitro de los MNVs de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* BO01 a diferentes concentraciones.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Concentración	3	31787	10595,60	46,29	0,000
Error	89	20372	228,90		
Total	92	52159			

C. V. = 11,82 %

Anexo 10. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vitro de los MNVs (30 %) de *Trichoderma* spp. sobre la germinación de conidios de *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Cepa	9	259,40	28,83	2,80	0,026
Error	20	205,80	10,29		
Total	29	465,20			

C. V. = 7,67 %

Anexo 11. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vitro de los MNVs (40 %) de *Trichoderma* spp. sobre la germinación de conidios de *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Cepa	9	388,30	43,14	4,08	0,004
Error	20	211,30	10,56		
Total	29	599,50			

C. V. = 7,28 %

Anexo 12. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vitro de los MNVs (50 %) de *Trichoderma* spp. sobre la germinación de conidios de *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Cepa	9	733,80	81,54	8,30	0,000
Error	20	196,50	9,82		
Total	29	930,30			

C. V. = 7,81 %

Anexo 13. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vitro de los MNVs de *Trichoderma* spp. sobre la germinación de conidios de *Botrytis cinerea* BO01 a diferentes concentraciones.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Concentración	3	8155	2718,39	121,16	0,000
Error	89	1997	22,44		
Total	92	10152			

C. V. = 16,61 %

Anexo 14. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vivo de MNVs (30 %) de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Cepa	9	925,40	102,83	2,95	0,121
Error	20	696,70	34,84		
Total	29	1622,10			

C. V. = 14,42 %

Anexo 15. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vivo de MNVs (40 %) de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor <i>p</i> (0,05)
Cepa	9	595,20	66,13	1,75	0,143
Error	20	756,40	37,82		
Total	29	1351,60			

C. V. = 19,91 %

Anexo 16. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vivo de MNVs (50 %) de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* BO01.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor <i>p</i> (0,05)
Cepa	9	763,90	84,88	1,18	0,359
Error	20	1438,30	71,91		
Total	29	2202,20			

C. V. = 18,35 %

Anexo 17. Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vivo de los MNVs de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* BO01 a diferentes concentraciones.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p (0,05)
Concentración	3	24396	8132,14	139,72	0,000
Error	89	5180	58,20		
Total	92	29576			

C. V. = 21,55 %



Bach. Jose fernando Sandoval Niebles

Tesista



Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina

Asesor de Tesis