

## Actividad Inhibitoria *In Vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea*, Agente Causal del Moho Gris en Frambuesa

### *In Vitro* Inhibitory Activity of *Trichoderma* spp. on *Botrytis cinerea*, Causal Agent of Gray Mold in Raspberry

Citlalli Casandra Arámbula-Zúñiga, Wilberth Chan-Cupul, Juan Carlos Sánchez-Rangel,  
Marco Tulio Buenrostro-Nava, Gilberto Manzo-Sánchez\*

Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Autopista Colima-  
Manzanillo km. 40, CP. 28930, Tecomán, Colima, México.

Autor para correspondencia\*: [gmanzo@ucol.mx](mailto:gmanzo@ucol.mx)

#### RESUMEN

*Botrytis cinerea* es un fitopatógeno con hábito necrotrófico que afecta alrededor de 200 especies vegetales, entre ellas arándano, fresa, frambuesa y zarzamora, las cuales son de importancia económica por su demanda en el mercado extranjero. La aplicación de fungicidas químicos es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de salud humana y contaminación ambiental. Por lo anterior, surge la necesidad del empleo de agentes de control biológico antagonistas a *B. cinerea*. En el presente estudio se evaluó la actividad inhibitoria *in vitro* de aislamientos nativos de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *B. cinerea* aislado de frambuesa. Se recolectó suelo de la rizosfera de cultivos de café, plátano, melón y arándano, de los cuales se obtuvieron ocho aislamientos de *Trichoderma*. Se realizaron pruebas de antagonismo de cada aislamiento de *Trichoderma* sobre *B. cinerea*. Se midió la tasa de crecimiento y esporulación de los aislamientos de *Trichoderma*. Los resultados mostraron a las 24 horas después de la interacción, una diferencia altamente significativa entre los tratamientos para la variable de crecimiento radial, siendo el tratamiento T362 el que tuvo el mínimo crecimiento de 3.00 mm, mientras que SP12 mostró el mayor crecimiento con 6.75 mm ( $F=2.09$ ;  $P=0.0073$ ). A las 48 horas SV1 presentó 14.00 mm, mientras que TC1 30.75 mm ( $F=1.95$ ;  $P=0.0073$ ). A las 72 horas SV1 presentó 14.00 mm mientras que TC1 30.75 mm ( $F=1.95$ ;  $P=0.062$ ). Para las 72 h el menor crecimiento lo presentó SV1 (27.50 mm) y el mayor fue TC1 (37.50 mm). Cinco de los ocho aislamientos de *Trichoderma* presentaron un porcentaje de inhibición superior al 50%. Finalmente, se determinó que TC1 a las 72 h presentó un 77.74% de inhibición del patógeno, con una esporulación muy abundante y una capacidad de inhibición de 4, lo que lo hace atractivo para el control de *B. cinerea* agente causal del moho gris en frambuesa.

#### ABSTRACT

*Botrytis cinerea* is a phytopathogen with a necrotrophic habit that affects around 200 plant species, including blueberry, strawberry, raspberry and blackberry, which are of economic importance due to their demand in the foreign market. The application of chemical fungicides is increasingly less recommended and more restricted due to human health and environmental pollution problems. Due to the above, the need arises for the use of biological control agents antagonistic to *B. cinerea*. In the present study, the *in vitro* inhibitory activity of native *Trichoderma* isolates on the growth of *B. cinerea* isolated from raspberry was evaluated. Soil was collected from the rhizosphere of coffee, banana, melon and blueberry crops, from which eight *Trichoderma* isolates were isolated. Antagonism tests of each *Trichoderma* isolate on *B. cinerea* were performed. The growth and sporulation rate of *Trichoderma* isolates was measured. According to the analysis of variance at 24 hours after the interaction, it showed a highly significant difference between the treatments for the radial growth variable, with treatment T362 being the one that had the minimum growth of 3.00 mm, while SP12 showed the greatest growth with 6.75 mm ( $F=2.09$ ;  $P=0.0073$ ). At 48 hours SV1 presented 14.00 mm, while TC1 30.75 mm ( $F=1.9$ ;  $P=0.062$ ). For 72 h, the smallest growth was shown by SV1 (27.50 mm) and the greatest was TC1 (37.50 mm). Five of the eight *Trichoderma* isolates presented an inhibition percentage greater than 50%. Finally, it was determined that TC1 at 72 h presented 77.74% inhibition of the pathogen, had a very abundant sporulation capacity and an inhibition capacity of 4, which makes it attractive for the control of *B. cinerea*, the causal agent of mold in raspberry.

**Key words:** biological control, rhizosphere, sporulation, antagonism.

**Palabras clave:** control biológico, rizosfera, esporulación, antagonismo.

## INTRODUCCIÓN

El hongo *Botrytis cinerea* es un fitopatógeno con hábito necrotrófico que ataca alrededor de 200 especies vegetales, entre los que destacan arándano, fresa, frambuesa, zarzamora, vid, pepino, calabaza, plantas ornamentales y forestales. *B. cinerea* se ubica en el segundo lugar en importancia entre todos los hongos fitopatógenos más conocidos (Dean *et al.*, 2012). Este patógeno induce una amplia variedad de síntomas, los cuales no pueden ser generalizados a través de los órganos y tejidos vegetales. Los más característicos son sobre hojas y frutos, con una pudrición suave, acompañada de colapso del parénquima, y seguida por un rápido desarrollo de masas grises de conidios (Williamson *et al.*, 2007).

*B. cinerea*, causa una enfermedad limitante, ya que disminuye la calidad y el valor comercial de los frutos (Williamson *et al.*, 2007). Ocasiona serias pérdidas antes y después de la recolección en cultivos de importancia económica. El patógeno puede atacar cualquier estado de desarrollo del cultivo e infectar diversos tejidos de la planta. Debido a la considerable incidencia del patógeno y a las repercusiones económicas que tiene, se han realizado numerosos estudios sobre la biología e interacciones de *B. cinerea* con sus hospederos, así como los métodos de control (Benito *et al.*, 2000).

Existen varios fungicidas recomendados para prevenir *B. cinerea*, entre los cuales están los benzimidazoles, dicarboximidas, anilino pirimidinas y carboxamidas. Sin embargo, la aplicación de estos productos tiene restricciones debido a su residualidad (Russel, 2004). Por lo que el control se logra integrando prácticas culturales. Por ejemplo, evitar las siembras demasiado densas, la solarización para el control de esclerocios, realizar podas y deshojados a ras del tallo para no dejar tocones que sirvan al desarrollo del patógeno. También se realiza la aplicación de fungicidas para cubrir y sanitizar las heridas. No obstante, la aplicación de fungicidas es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de salud humana y contaminación ambiental que deriva de su aplicación. Actualmente, cada vez son mayores las objeciones de orden higiénico-sanitarias a la aplicación de fungicidas, debido a que estos son agentes oncogénicos potenciales cuando son aplicados a las frutas y verduras (Benito *et al.*, 2000).

Por otro lado, para el control biológico del moho gris se han descrito la aplicación de diversos géneros de hongos (*Trichoderma* spp., *Coniothyrium* spp., *Gliocladium* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp. y *Verticilium* spp.) y bacterias como antagonistas, citando a los primeros como los más importantes. Los estudios sobre el potencial antagonista de *Trichoderma* sobre *Botrytis cinerea* ha demostrado altos porcentajes de inhibición. Por ejemplo, Pincay *et al.* (2021),

## INTRODUCTION

The fungus *Botrytis cinerea* is a necrotrophic phytopathogen that attacks approximately 200 plant species, including blueberry, strawberry, raspberry, blackberry, grape, cucumber, pumpkin, ornamental, and forest plants. *B. cinerea* ranks second in importance among all well-known phytopathogenic fungi (Dean *et al.*, 2012). Induces a wide variety of symptoms that cannot be generalized across plant organs and tissues. The most characteristic symptoms occur on leaves and fruits, with soft rot, accompanied by parenchyma collapse, and followed by the rapid development of gray masses of conidia (Williamson *et al.*, 2007).

*B. cinerea* causes a limiting disease as it reduces the quality and commercial value of fruits (Williamson *et al.*, 2007). It results in serious losses before and after harvest in economically important crops. The pathogen can attack any developmental stage of the crop and infect various plant tissues. Due to the significant incidence of the pathogen and its economic repercussions, numerous studies have been conducted on the biology and interactions of *B. cinerea* with its hosts, as well as control methods (Benito *et al.*, 2000).

Several fungicides are recommended to prevent *B. cinerea*, including benzimidazoles, dicarboximides, anilinopyrimidines, and carboxamides. However, the application of these products is restricted due to their residuality (Russel, 2004). Therefore, control is achieved by integrating cultural practices, such as avoiding overly dense plantings, solarization for sclerotia control, pruning, and leaf removal at the stem base to prevent pathogen development. Fungicides are also applied to cover and sanitize wounds. However, the use of fungicides is increasingly less recommended and more restricted due to human health problems and environmental contamination resulting from their application. Currently, there are growing objections on hygienic-sanitary grounds to the application of fungicides because they are potential oncogenic agents when applied to fruits and vegetables (Benito *et al.*, 2000).

On the other hand, various genera of fungi (*Trichoderma* spp., *Coniothyrium* spp., *Gliocladium* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., and *Verticilium* spp.) and bacteria have been described for the biological control of gray mold, with fungi, especially *Trichoderma*, being the most important. Studies on the antagonist potential of *Trichoderma* against *Botrytis cinerea* have shown high inhibition percentages. For example, Pincay *et al.* (2021) determined the inhibition of *Trichoderma* sp. and *T. asperellum* on *B. cinerea* at 75.1% and 73.7%, respectively. Similarly, Calvo-Araya *et al.* (2012) demonstrated that *Trichoderma* isolates inhibited *B. cinerea* by 91.43%.

In this context, the soil harbors various microorganisms with antagonistic capacity against phytopathogenic microorganisms, with *Trichoderma* spp.

determinaron la inhibición de *Trichoderma* sp. y *T. asperellum* sobre *B. cinerea* en un 75.1% y 73.7%, respectivamente. De igual manera, Calvo-Araya *et al.* (2012), demostraron que aislamientos de *Trichoderma* inhibieron un 91.43% a *B. cinerea*.

En este sentido, el suelo alberga diversos microorganismos con capacidad antagonica hacia microorganismos fitopatógenos, el más estudiado es *Trichoderma* spp. por su fácil y rápido crecimiento, su capacidad para micoparasitar hongos fitopatógenos (Woo *et al.*, 2023), inhibir el crecimiento de otros hongos mediante la competencia por espacio y nutrientes, así como por la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores. Estos hongos se emplean a utilizar en mayor frecuencia en la agricultura para incrementar el rendimiento y el control de enfermedades (Gupta *et al.*, 2014).

Por lo antes planteado, es de importancia realizar un estudio sobre el antagonismo *in vitro* de aislados de *Trichoderma* spp. sobre *B. cinerea*. Los resultados de este estudio se podrían usar para encontrar futuras aplicaciones en campo para el control biológico del moho gris.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de experimentación

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima, ubicado en el km 40 de la carretera Colima-Manzanillo en Tecoman, Colima, México a 18°57'10.82"LN y 103°53'39.83"LO (Google Earth, 2023).

### Aislamiento de *Botrytis cinerea*

El aislamiento que se usó en este estudio fue obtenido de frutos infectados de frambuesa recolectados de huertos comerciales en la localidad de Quesería del municipio de Cuauhtémoc, Colima, estos fueron colocados dentro de bolsas de polietileno y transportadas en hielera al laboratorio (Li *et al.*, 2012). El aislamiento del fitopatógeno se realizó empleando la técnica de cámara húmeda para estimular la esporulación y posteriormente, con la ayuda de una aguja de disección estéril se rasparon los conidios sin tocar la fruta, estos se suspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas mL<sup>-1</sup> (Li *et al.*, 2012). Posteriormente, se empleó alícuotas de 200 µL de la suspensión de esporas y se transfirieron al medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) con ácido láctico al 01% en cajas de Petri. Se incubaron a 20 °C en oscuridad, durante 36 h y en seguida, cuando los conidios germinaron, se obtuvieron colonias monospóricas usando el método de Li *et al.* (2012).

### Aislamientos de *Trichoderma*

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. que se

being the most studied for its easy and rapid growth, ability to mycoparasitize phytopathogenic fungi (Woo *et al.*, 2023), inhibit the growth of other fungi through competition for space and nutrients, and through the secretion of enzymes and the production of inhibitory compounds. These fungi are increasingly used in agriculture to increase yield and disease control (Gupta *et al.*, 2014).

Given the above, it is important to conduct a study on the *in vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. isolates against *B. cinerea*. The results of this study could be used to find future field applications for the biological control of gray mold.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimentation site

This research was conducted at the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Biological and the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Biological and Agricultural Sciences of the University of Colima, located at kilometer 40 on the Colima-Manzanillo highway in Tecoman, Colima, Mexico, at 18°57'10.82"N and 103°53'39.83"W (Google Earth, 2023).

### Isolation of *Botrytis cinerea*

The isolation used in this study was obtained from infected raspberry fruits collected from commercial orchards in the locality of Quesería in the municipality of Cuauhtémoc, Colima. The fruits were placed in polyethylene bags and transported in a cooler to the laboratory (Li *et al.*, 2012). Isolation of the phytopathogen was performed using the moist chamber technique to stimulate sporulation. Subsequently, with the help of a sterile dissection needle, conidia were scraped without touching the fruit. These were suspended in 1 mL of sterile distilled water and adjusted to a concentration of  $1 \times 10^6$  spores mL<sup>-1</sup> (Li *et al.*, 2012). Subsequently, aliquots of 200 µL of the spore suspension were transferred to potato dextrose agar (PDA) culture medium with 0.1% lactic acid in Petri dishes. They were incubated at 20 °C in darkness for 36 hours. Once the conidia germinated, monosporic colonies were obtained using the method described by Li *et al.* (2012).

### *Trichoderma* isolates

*Trichoderma* spp. isolates used in this study were isolated from the rhizosphere of various crops, as presented in Table 1. Samples were transported in polyethylene bags for processing in the laboratory. Ten grams of soil from each sample were placed in 90 mL of sterile distilled water, shaken for 20 to 30 minutes. A 1 mL aliquot was taken and diluted in a Falcon tube with 9 mL of sterile distilled water; this procedure was repeated five times consecutively. Subsequently, 1 mL aliquot of the last three dilutions was taken and deposited in Petri dishes with selective culture medium for *Trichoderma*.

utilizaron en este estudio fueron aisladas de la rizosfera de diversos cultivos, las cuales se presentan en el Cuadro 1. Las muestras fueron transportadas en bolsas de polietileno para procesarlas en el laboratorio. Se tomaron 10 g de suelo de cada muestra y se colocó en 90 mL de agua destilada estéril, se agitó durante 20 a 30 min. Se tomó una alícuota de 1 mL y se diluyó en un tubo Falcon con 9 mL de agua destilada estéril, este procedimiento se repitió cinco veces consecutivas. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL de las últimas tres diluciones y se depositaron en cajas de Petri con medio de cultivo selectivo para *Trichoderma*.

Se incubaron a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante una semana hasta que se observaran el desarrollo de colonias fúngicas de color verdoso, estas fueron sembradas en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se procedió a su identificación a través del montaje en lámina y el uso de las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972).

Todos los aislamientos fueron purificados y preservados en forma de micelio en crioviales con glicerol al 10% a temperatura de  $4^\circ\text{C}$ .

They were incubated at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  for one week until the development of greenish fungal colonies, which were then planted in potato dextrose agar (PDA) culture medium, and their identification was carried out through slide mounting using the taxonomic keys of Barnett and Hunter (1972). All isolates were purified and preserved as mycelium in cryovials with 10% glycerol at  $4^\circ\text{C}$ .

***In vitro* confrontation between *Trichoderma* spp. isolates and *B. cinerea***

This was carried out through a dual-growth test according to Cherif and Benhamou (1990). Discs of each fungus were placed 5.9 cm apart in each Petri dish and incubated at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (12-hour photoperiod, 15 days). The experimental unit consisted of one Petri dish.

**Radial growth, percentage of inhibition, and sporulation.**

The radial growth of both *Trichoderma* spp. and *B. cinerea* was measured every 24 hours using a graduated ruler in millimeters. The daily growth rate (TCD) was calculated using the formula:  $\text{TCD} = \frac{R1 - R2}{(T1 - T2) / n}$ , where "n" is the number of evaluations, and "R1" and "R2" are the radial growths of both fungi (in millimeters) at times "T1" and "T2" (in days) (Baldrian and Gabriel, 2002).

**Cuadro 1.** Aislamientos de *Trichoderma* spp. usadas en el presente estudio.

**Table 1.** *Trichoderma* spp. isolated used in the present study.

Clave	Rizosfera	Localidad
TC1	Cafeto	Suchitlán, Comala, Colima.
TC5	Cafeto	Suchitlán, Comala, Colima.
SV1	Plátano	San Vicente, Coahuayana, Michoacán
JN1	Plátano	Ranchito, Coahuayana, Michoacán
PE1	Melón	Armería, Colima.
T362	Melón	Armería, Colima.
SP3	Arándano	Cuauhtémoc, Colima
SP12	Arándano	Cuauhtémoc, Colima

**Confrontación *in vitro* entre aislamientos de *Trichoderma* spp. y *B. cinerea***

Esta se realizó mediante una prueba de crecimiento dual de acuerdo con Cherif y Benhamou (1990). Los discos de cada hongo se pusieron a 5.9 cm de distancia, uno del otro, en cada caja de Petri y estas se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Using the growth rate, the percentage of radial growth inhibition (PICR) of *B. cinerea* was calculated with the formula  $\text{PICR} = \frac{(R1 - R2)}{R1} * 100$ , where "R1" is the radius of the pathogen (*Botrytis*) and "R2" is the radius of the pathogen in confrontation (Fernández and Suárez, 2009) (Table 2). The sporulation of each *Trichoderma* strain was



**Crecimiento radial, porcentaje de inhibición y esporulación**

Se midió el crecimiento radial tanto de *Trichoderma* spp. y *B. cinerea* cada 24 h usando una regla graduada en mm y se calculó la tasa de crecimiento diario (TCD) con la siguiente fórmula:  $TCD = [\sum = (R1 - R2) / (T1-T2) / n]$ , en donde n es el número de evaluaciones, R1 y R2 son el crecimiento radial de ambos hongos (en mm) en los tiempos T1 y T2 (en días) (Baldrian y Gabriel, 2002). Con la tasa de crecimiento, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *B. cinerea* mediante la fórmula  $PICR = [(R1-R2) / R1]*100$ , donde R1 es el radio del patógeno (*Botrytis*) y R2 es el radio del patógeno en confrontación (Fernández y Suárez, 2009) (Cuadro 2).

La esporulación de cada cepa de *Trichoderma* se cuantificó tanto en la colonia del patógeno como en el de *Trichoderma*, para esto se tomaron cinco discos de micelio (5 mm) y se depositaron en cinco mL de agua con Tween al 0.05% (v/v), la mezcla se agitó durante 10 min en un vórtex. Posteriormente, la concentración de esporas se cuantificó en una cámara de Neubauer a través de un microscopio con el lente de 40X. La capacidad de esporulación se estimó visualmente después de cuatro días de incubación. Se utilizó una escala de la siguiente manera; muy abundante: cuando cubrió del 80-100% la superficie del medio; abundante: cuando cubrió alrededor del 50-79%; intermedia: cuando cubrió aproximadamente del 11-49%; escasa: cuando se observó menos del 1-10% de esporulación en la superficie y nula: cuando no se observó esporulación.

quantified in both the pathogen's colony and the *Trichoderma* colony. For this, five mycelium discs (5 mm) were taken and placed in five mL of water with 0.05% Tween (v/v). The mixture was agitated for 10 minutes in a vortex. Subsequently, the spore concentration was quantified in a Neubauer chamber using a microscope with a 40X lens. The sporulation capacity was visually estimated after four days of incubation, using the following scale: very abundant when it covered 80-100% of the medium surface; abundant when it covered around 50-79%; intermediate when it covered approximately 11-49%; scarce when less than 1-10% sporulation was observed on the surface; and null when no sporulation was observed.

**Days in contact and type of inhibitory activity**

Data were collected every 24 hours to determine the number of days until the first contact between the hyphae of the two fungi in the interaction zone. To indicate the inhibitory capacity as a possible mechanism of action of *Trichoderma* spp., macroscopic observations were made, using the invasion of the antagonist on the surface of the pathogenic mycelium as an index of mycoparasitism. This was assessed using the scale proposed by Ezziyyani *et al.* (2004) (Table 3).

**Experimental design**

The treatments were distributed under a completely randomized experimental design with eight isolates of

**Cuadro 2.** Bioensayos de inhibición entre los aislamientos de *Trichoderma* spp. y *Botrytis cinerea* aislado de frambuesa.

**Table 2.** Inhibition bioassays between isolates of *Trichoderma* spp. and *Botrytis cinerea* isolated from raspberry.

Tratamiento	Descripción
1	TC1 + <i>Botrytis cinerea</i>
2	SV1 + <i>Botrytis cinerea</i>
3	JN1 + <i>Botrytis cinerea</i>
4	PE1 + <i>Botrytis cinerea</i>
5	TC5 + <i>Botrytis cinerea</i>
6	T362 + <i>Botrytis cinerea</i>
7	SP3 + <i>Botrytis cinerea</i>
8	SP12 + <i>Botrytis cinerea</i>
9	<i>Botrytis cinerea</i>
10	TC1
11	SV1
12	JN1
13	PE1
14	TC5
15	T362
16	SP3
17	SP12

Los tratamientos 9-17 fueron considerados como testigos.

### Días en contacto y clase de actividad inhibitoria

Se tomaron datos cada 24 h para determinar el número de días al primer contacto entre las hifas de los dos hongos en la zona de interacción. Para indicar su capacidad de inhibición como posible mecanismo de acción de *Trichoderma* spp. se realizaron observaciones macroscópicas, tomándose como índice de micoparasitismo, la invasión del antagonista sobre la superficie del micelio patógeno usando la escala propuesta por Ezziyani *et al.* (2004) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Escala de evaluación de inhibición a partir de la invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea*.

**Table 3.** Inhibition evaluation scale based on surface invasion, colonization and sporulation of *Trichoderma* spp. on *Botrytis cinerea*.

Grado	Capacidad de inhibición
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno
1	Invasión de 1/4 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
2	Invasión de 1/2 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
3	Invasión de 3/4 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella

### Diseño experimental

Los tratamientos fueron distribuidos bajo un diseño experimental completamente al azar con ocho aislamientos de *Trichoderma* spp. y un aislado de *B. cinerea*. Cada unidad experimental constó de una caja Petri y se replicó cuatro veces.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el crecimiento radial y porcentaje de inhibición se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) usando el paquete estadístico SAS (1997).

### RESULTADOS

Según el análisis de varianza de la tasa de crecimiento y esporulación de los aislados de *Trichoderma* spp. después de 24 hr de incubación, se observaron diferencias altamente significativas ( $F=2.09$ ;  $P=0.0073$ ), mientras que a las 48 horas se mostró una diferencia significativa entre los tratamientos ( $F=1.95$ ;  $P=0.062$ ). Finalmente, a las 72 horas se evidenció una diferencia altamente significativa entre los tratamientos evaluados ( $F=2.55$ ;  $P=0.0032$ ) (Cuadro 4).

En base a la prueba de Tukey ( $P=0.05$ ), a las 24 h el crecimiento de los aislados de *Trichoderma* se aglomeró en tres grupos; siendo SP12 + *B. cinerea* la que presentó el mayor crecimiento con 6.75 mm, el menor crecimiento se presentó T362 + *B. cinerea*, con 3.00 mm. En cambio, a las 48 h el tratamiento TC1 + *B. cinerea* presentó el mayor

*Trichoderma* spp. and one isolate of *B. cinerea*. Each experimental unit consisted of a Petri dish and was replicated four times.

### Statistical analysis

The data obtained on radial growth and percentage of inhibition were subjected to analysis of variance and Tukey's mean comparison test ( $p \leq 0.05$ ) using the SAS statistical package (1997).

### RESULTS

According to the analysis of variance of the growth rate and sporulation of *Trichoderma* spp. isolates after 24 hours of incubation, highly significant differences were observed ( $F=2.09$ ;  $P=0.0073$ ), while at 48 hours, a significant difference between treatments was shown ( $F=1.95$ ;  $P=0.062$ ). Finally, at 72 hours, a highly significant difference between the evaluated treatments was evident ( $F=2.55$ ;  $P=0.0032$ ) (Table 4).

Based on the Tukey test ( $P=0.05$ ), at 24 h, the growth of *Trichoderma* isolates clustered into three groups, with SP12 + *B. cinerea* showing the highest growth at 6.75 mm, and the lowest growth was observed in T362 + B, with 3.00 mm. In contrast, at 48 h, treatment TC1 + *B. cinerea* exhibited the highest radial growth at 30.75 mm, and treatment SV1 + *B. cinerea* showed the lowest radial growth at 14.00 mm (Table 4).

At 72 h, the radial growth of the phytopathogen in dual culture showed a highly significant difference between treatments ( $F=2.35$ ;  $P=0.0236$ ).

The Tukey test ( $P=0.05$ ) identified the treatment SV1 + *B. cinerea* as having the highest growth, recording 36.50 mm, while the lowest radial growth was observed in treatment TC1 + *B. cinerea* at 5.75 mm. No differences in radial growth were observed between *Botrytis* (Table 4).

### Radial growth of *Botrytis cinerea* in dual confrontation.

Regarding the days to contact between hyphae, the behavior was homogeneous, and the Analysis of variance

crecimiento con 6.75 mm, el menor crecimiento se presentó T362 + *B. cinerea*, con 3.00 mm. En cambio, a las 48 h el tratamiento TC1 + *B. cinerea* presentó el mayor crecimiento radial con 30.75 mm y el tratamiento SV1 + *B. cinerea* el menor crecimiento radial con 14.00 mm. Mientras que para las 72 h TC1 mostró el mayor crecimiento con 37.50 mm, en cambio SV1 fue el menor con 27.5 mm (Cuadro 4).

A las 72 h el crecimiento radial del fitopatógeno en cultivo dual mostró una diferencia altamente significativa entre los tratamientos (F=2.35; P=0.0236) la prueba de Tukey (P=0.05), mostró al tratamiento SV1 + *B. cinerea* como el de mayor crecimiento al registrar 36.50 mm; el menor crecimiento se presentó en el tratamiento TC1 + *B. cinerea* con 5.75 mm de crecimiento radial. No se observaron diferencias de crecimiento radial entre *Botrytis* (Cuadro 4).

showed a non-significant difference between treatments (F=1.35; P=0.1847) (Table 5). Differences were observed in the inhibitory capacity of *Trichoderma* on *Botrytis*, with isolates TC1 and SP12 showing a level 4.

**Inhibition of the growth of *Botrytis cinerea* by *Trichoderma* spp.**

Regarding the reduction of *B. cinerea* growth in dual cultures, on the second day of the trial, the TC1 strain exhibited the highest inhibition percentage at 77.74%, followed by SP12 at 70%, JN1 at 60%, PE1 at 55.0%, and SP3 at 50.0%, with significant differences between treatments. In addition, the degree of inhibition was categorized into four groups: TC1 in high degree (80-85%), SP12, JN1, and PE1 in medium degree (59-80%), SP3 in low degree (49-59%), and SV1, TC5, and T362 in scarce

**Cuadro 4.** Crecimiento radial (mm) de aislados de *Trichoderma* spp. en confrontación con *Botrytis cinerea* a las 24 h, 48 h y 72 h de incubación.

**Table 4.** Radial growth (mm), of isolates of *Trichoderma* spp. in confrontation with *Botrytis cinerea* to 24 h, 48 h and 72 h of incubation.

Tratamiento	24 h (mm)	48 h (mm)	72 h (mm)
TC1 + <i>B. cinerea</i>	5.25ab	30.75a	37.50a
SV1 + <i>B. cinerea</i>	5.00ab	14.00b	27.50c
JN1 + <i>B. cinerea</i>	4.00b	25.25ab	32.80a
PE1 + <i>B. cinerea</i>	5.00ab	23.50ab	30.40b
TC5 + <i>B. cinerea</i>	4.00b	14.75b	28.30b
T362 + <i>B. cinerea</i>	3.00c	17.50ab	29.70b
SP3 + <i>B. cinerea</i>	5.25ab	29.50a	33.60a
SP12 + <i>B. cinerea</i>	6.75a	29.25a	37.10a

Literales entre columnas y seguidas de la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey=0.05).

Literals between columns and followed by the same letter are statistically equal (Tukey=0.05).

**Crecimiento radial de *Botrytis cinerea* en confrontación dual.**

Respecto a los días al contacto entre hifas, el comportamiento fue homogéneo y el análisis de varianza mostró una diferencia no significativa entre tratamientos (F=1.35; P=0.1847) (Cuadro 5). Se mostraron diferencias entre la capacidad de inhibición de *Trichoderma* sobre *Botrytis*, siendo los aislados TC1 y SP12 los que mostraron un nivel 4, mientras que JN1, PE1 y SP3 nivel 2 y los aislados SV1, TC5 y SP3 tuvieron nivel 1.

**Inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* por *Trichoderma* spp.**

Con respecto a la reducción del crecimiento de *B. cinerea* en los cultivos duales, al segundo día del ensayo, la cepa TC1 exhibió el mayor porcentaje de inhibición con un

degree (<49%). Five out of the eight strains showed an inhibition percentage higher than 50% (Figure 1).

**DISCUSSION**

The results of this study demonstrated that *Trichoderma* spp. isolates obtained from the rhizosphere of coffee, banana, melon, and blueberry exhibited inhibitory activity against the phytopathogenic fungus *B. cinerea* isolated from raspberry. It could be said that in this type of disease, the treatment is preventive rather than curative. For this reason, it is more effective to use an antagonist with the ability to inhibit early (Fernández and Suárez, 2009), as the TC1 isolate did, which showed 77.74% inhibition of the pathogen at 72 h.

Regarding the inhibition of *B. cinerea* growth, the

77.74%, seguido por SP12, con un 70%, JN1 un 60% PE1 con un 55.0% y SP3 un 50.0% con diferencias significativas entre los tratamientos.

TC1 isolate stood out as the most prominent, showing an inhibition percentage toward *B. cinerea* of 77.74%. In the second place, SP12 exhibited 70.0%, while JN1 showed 60.0%, PE1 55.0%, and SP3 50.0%.

**Cuadro 5.** Crecimiento radial a las 72 h de *Botrytis cinerea* en confrontación con aislados de *Trichoderma* spp., días a contacto y capacidad de inhibición de aislados de *Trichoderma* spp.

**Table 5.** Radial growth at 72 h of *Botrytis cinerea* in confrontation with isolates of *Trichoderma* spp., days of contact and inhibition capacity of isolates of *Trichoderma* spp.

Tratamiento	Crecimiento radial (mm)	Días a contacto	Capacidad de Inhibición
TC1 + <i>B. cinerea</i>	5.75b	3.0	4
SV1 + <i>B. cinerea</i>	36.50a	3.0	1
JN1 + <i>B. cinerea</i>	10.50b	3.0	2
PE1 + <i>B. cinerea</i>	12.25b	3.0	2
TC5 + <i>B. cinerea</i>	34.00a	3.0	1
T362 + <i>B. cinerea</i>	32.75a	3.0	1
SP3 + <i>B. cinerea</i>	13.25b	3.0	2
SP12 + <i>B. cinerea</i>	6.75b	3.0	4

Literales entre columnas y seguidas de la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey=0.05). Evaluación de inhibición, según (Ezziyani *et al.*, 2004). 0= Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno; 1= Invasión de 1/4 de la superficie de la colonia del hongo patógeno; 2= Invasión de 1/2 de la superficie de la colonia del hongo patógeno; 3= Invasión de 3/4 de la superficie de la colonia del hongo patógeno y 4= Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

Literals between columns and followed by the same letter are statistically equal (Tukey=0-05). Inhibition evaluation, according to (Ezziyani *et al.*, 2004). 0= No invasion of the surface of the pathogenic fungal colony; 1= Invasion of 1/4 of the surface of the pathogenic fungal colony; 2= Invasion of 1/2 of the surface the pathogenic fungal colony; 3= Invasion of 3/4 of the surface of the pathogenic fungal colony; 4= Total invasion of the surface of the colony of the pathogenic fungus by sporulating on it.

Aunado a esto, el grado de inhibición se categorizó en cuatro grupos: TC1 en grado alto (80-85%), SP12, JN1y PE1 en grado medio (59-80%), SP3 en grado bajo (49-59%) y SV1, TC5 y T362 en grado escaso (<49%), cinco de las ocho cepas presentaron un porcentaje de inhibición superior al 50% (Figura 1).

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo demostraron que los aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos de la rizosfera de café, plátano, melón y arándano presentaron actividad inhibitoria contra al hongo fitopatógeno *B. cinerea* aislado de frambuesa. Se podría decir que en este tipo de enfermedades el tratamiento es preventivo y no curativo. Por esta razón, resulta más efectivo utilizar un antagonista que tenga la capacidad de inhibir de forma temprana (Fernández y Suárez, 2009), como lo hizo el aislamiento TC1, el cual a las 72 h mostró un 77.74% de inhibición del patógeno.

Con respecto a la inhibición del crecimiento de *B. cinerea*, se logró diferenciar el aislado TC1 como el más

This can be explained based on the antagonistic activity of *Trichoderma*, such as mycoparasitism, antibiosis with the production of enzymes and secondary metabolites that are essential in many interactions causing the destruction of the pathogen (Woo *et al.*, 2023). These results are similar to those reported by Fan *et al.* (2023), where they evaluated nine 2023). *Trichoderma* isolates on the percentage inhibition of *B. cinerea*, demonstrating between 13.9% and 63.0%.

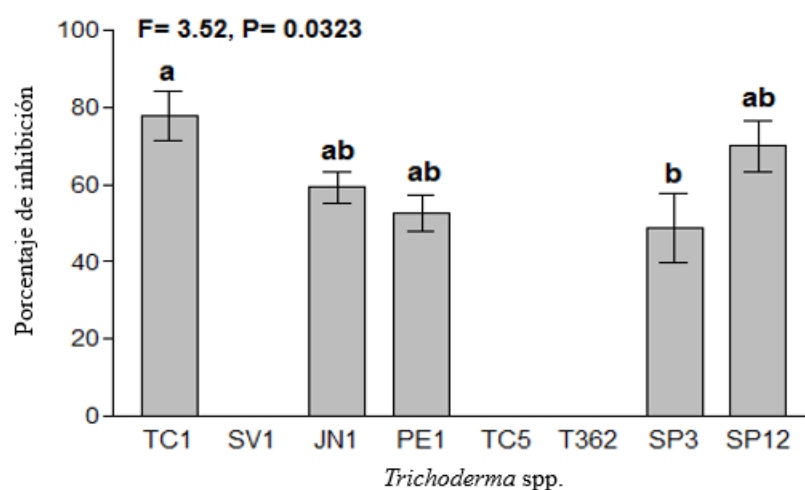
As for the days to contact between hyphae, all strains came into contact after three days, results that agree with Pincay *et al.* (2021), who reported a contact of three to four days in the interaction between *Trichoderma* strains on *F. subglutinans*.

According to the results obtained in this study, it is recommended to select the TC1 and SP12 strains as the most potential candidates for use in future experiments, both in greenhouses and in the field, to demonstrate their effectiveness in the biological control of *B. cinerea* in raspberry cultivation.



sobresaliente, ya que mostró un porcentaje de inhibición hacia *B. cinerea* de un 77.74%, en segundo plano SP12 un 70.0%, mientras que JN1 con un 60.0%, PE1 un 55.0% y SP3 50.0%, esto puede explicarse con base a la actividad antagonista de *Trichoderma* como lo son micoparasitismo, la antibiosis con la producción de enzimas y metabolitos secundarios que son indispensables en muchas interacciones que causan la destrucción del patógeno (Woo *et al.*, 2023). Estos resultados son parecidos a los reportados por Fan *et al.* (2023), en donde ellos evaluaron nueve aislados de *Trichoderma* sobre el porcentaje de inhibición de *B. cinerea*, demostraron entre el 13.9% a un 63.0% de inhibición del patógeno.

It has been shown that the application of *Trichoderma* for the control of *Botrytis cinerea* in strawberries significantly reduced the development of the pathogen in the plant by 32% (Williamson *et al.*, 2007). This demonstrates high potential as a biological control agent. Our results showed that the TC1 isolate had an inhibition percentage of 77.74%, whereas those reported by Lario-Palacios *et al.* (2020), who evaluated different conventional products, homeopathic substances, and *T. harzianum* under in vitro conditions, inhibited 36.2% of *B. cinerea*.



**Figura 1.** Porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* por ocho aislados de *Trichoderma* spp. (TC1, SV1, JN1, PE1, TC5, T362, SP3 y SP12) a las 72 h de incubación. Medias ( $\pm$  error estándar, n = 4) con diferente literal, son significativamente diferentes entre sí (Prueba de Tukey P=0.05).

**Figure 1.** Percentage of inhibition *Botrytis cinerea* by eight isolates of *Trichoderma* spp. TC1, SV1, JN1, PE1, TC5, T362, SP3 and SP12 to 72 h of incubation. Means ( $\pm$  standard error, n = 4) with different literals are significantly different from each other (Tukey Test P=0.05).

En lo que respecta a los días a contacto entre las hifas, todas las cepas entraron en contacto a los tres días, resultados que concuerdan con Pincay *et al.* (2021), quienes reportaron que su contacto es de tres a cuatro días; esto en interacción entre cepas de *Trichoderma* sobre *F. subglutinans*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda seleccionar las cepas TC1 y SP12 como los candidatos más potenciales para ser utilizados en futuros experimentos, tanto en invernadero como en campo a fin de demostrar su efectividad en el control biológico de *B. cinerea* en el cultivo de frambuesa.

Se ha demostrado que la aplicación de *Trichoderma* para el control de *Botrytis cinerea* en fresa, reduce significativamente en un 32% el desarrollo del patógeno en la planta (Williamson *et al.*, 2007), lo que demuestra un alto potencial como agente de control biológico.

Similar findings were reported by Acosta *et al.* (2021), who demonstrated that *T. atroviridae* inhibited 39.3% of *B. cinerea*. Meanwhile, Pincay *et al.* (2021) determined the inhibition of *Trichoderma* sp. and *T. asperellum* on *B. cinerea* at 75.1% and 73.7%, respectively.

## CONCLUSIONS

The *Trichoderma* spp. isolates used in this study showed different in vitro inhibitory capacity against *B. cinerea*; out of the eight *Trichoderma* spp. isolates, five showed more than 50% inhibition of the pathogen. The TC1 isolate, which exhibited an inhibition percentage of 77.74%, proved to be the most promising for the control of *B. cinerea*, the causal agent of gray mold in raspberry.

gico. Nuestros resultados mostraron que el aislado TC1 tuvo un porcentaje de inhibición del 77.74%, a diferencia de lo reportado por Lario-Palacios *et al.* (2020), quienes evaluaron en condiciones *in vitro* diferentes productos convencionales, sustancias homeopáticas y *T. harzianum*, este último inhibió un 36.2% de *B. cinerea*, algo similar reporta Acosta *et al.* (2021), quienes demostraron que *T. atroviridae* inhibió un 39.3% de *B. cinerea*, mientras que Pincay *et al.* (2021), determinaron la inhibición de *Trichoderma* sp. y *T. asperellum* sobre *B. cinerea* en un 75.1% y 73.7%, respectivamente.

## CONCLUSIONES

Los aislamientos del género *Trichoderma* spp. utilizados en este estudio presentaron diferente capacidad inhibitoria *in vitro* sobre *B. cinerea*; de los ocho aislados de *Trichoderma* spp. cinco mostraron más del 50% de inhibición del patógeno. Siendo el aislado TC1 el que presentó un porcentaje de inhibición de un 77.74%, resultando el más promisorio para el control de *B. cinerea* agente causal del moho gris en frambuesa.

## REFERENCIAS

- Acosta, L. T., Azania, D. K., & Azania, R. (2021). "Cultivo dual *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. patógeno de *Passiflora ligularis* Juss". *Revista de cinerea*; de los ocho aislados de *Trichoderma* spp. cinco mostraron más del 50% de inhibición del *Investigación Agropecuaria Science and Biotechnology*, 1(4), pp. 43–55. <https://doi.org/10.25127/riagrop.20214.720>
- Baldrian, P. & Gabriel, J. (2002). "Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*". *Mycological*, 94(3), pp. 428-436. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833208>
- Barnett, H. & Hunter, B. (1972). "Illustrated genera of imperfect fungi". EE. UU. Burgess Publ. Co., Doi:10.2307/3757954.
- Benito, E., Arranz, M. & Eslava, A. (2000). "Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*". *Revista Iberoamericana de Micología*, 17 S43-S46. <https://www.reviberoammicol.com/2000-17/S43S46.pdf>
- Cherif, S.S., & Benhamou, C.S. (1990). "Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* spp., on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*". *Phytopathology* 80(12), pp. 1406-1414. DOI: 10.1094/Phyto-80-1406.
- Calvo-Araya, J.A., Rivera-Coto, G., Orozco-Cayasso, S., & Orozco-Rodríguez, R. (2012). "Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora". *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), pp. 225-231. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1659-13212012000200001&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212012000200001&lng=en&tlng=es).
- Dean, R., Van Kan J.A.L., 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 Pathology*, 13(4), pp. 414-30. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Ezziyyani, M., Pérez, S.C., Requena, M.E., Rubio, L., & Candela, M.E. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* Ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*". *Anales de Biología*, 26(1), pp. 69-78. <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/30471>
- Fan Q, Lin H, Hu Y, et al. (2023). "Biocontrol of strawberry Botrytis gray mold and prolong the fruit shelf-life by fumigant *Trichoderma* spp.". *Research Square*, DOI: 10.21203/rs.3.rs-2868489/v1.
- Fernández Barbosa, R & Suárez Meza, C. (2009). "Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana". *Revista Facultad Nacional de Agricultura Medellín*, 62(1), pp. 4743-4748. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179915377001>.
- Google earth. (2023). Google software ver. 2022. Disponible en: [www.google.com](http://www.google.com) [Consultado 27-08-2023].
- Gupta, V. K., Schomoll, M., Herrera, A., Upadhyay, R., Druzhinina, I., & Tuohy, M. (2014). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Edt. Elsevier B.V. Holanda. Pp 549.
- Lario-Palacios, O.E., López-Vázquez, E.Y., Curiel-Rodríguez, A., Ruiz-Espinoza, F.J., Solano-Vidal, R., Serrato-Cruz, M.A. (2020). "Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*". *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11 (3), pp. 595-606. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2077>.
- Li, X., Kerrigan J., Chai W., & Schnabel G. (2012). "*Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina". *Mycologia*, 104(3), pp. 650–658. <https://doi.org/10.3852/11-218>
- Pincay, A., Noboa, M., Viera, W., Herrera, K., León, A., & Jackson, T. (2021). "Evaluación *in vitro* del potencial antagonista de *Trichoderma* sp. y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus* Benth) para el control de *Botrytis cinerea*". *Journal of Science and Research*, 6(1), pp. 109–124. <https://revistas.utb.edu.ec/index.php/sr/article/view/895>
- Russel, P. (2004). *Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management*. Crop Life International, Bruselas.
- SAS. (1997). "SAS/STAT User's guide." Realse 6.10 ed. SAS Institute, Inc; Cary, North Carolina. USA.
- 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), pp. 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Woo, S.L., Hermosa, R., Lorito, M., & Monte E. (2023). "*Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture". *Nature*

*Review of Microbiology*, 21: pp. 312–326.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5>