



CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* PARA EL CONTROL DEL MOHO GRIS (*Botrytis cinerea* Pers.) EN FRUTOS Y FLORES DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.)[†]

[NATIVE *Trichoderma* STRAINS FOR THE CONTROL OF GREY MOULD (*Botrytis cinerea* Pers.) IN FRUITS AND FLOWERS OF BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum* L.)]

Yasmin Carmen Arestegui-Cantoral¹, Eryka Gaslac-Zumaeta²
and Betsabe Leon-Ttacca^{1*}

¹ Universidad Nacional de Cañete, Casa de la cultura, Av. Mariscal Benavides, San Vicente de Cañete. Lima, Perú. Emails: aresteguiyc@gmail.com,

bleon@undc.edu.pe

² Grupo de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Calle Higos Urco 342, Chachapoyas, Amazonas, Perú. Email: eryka.gaslac@untrm.edu.pe

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Gray mold disease caused by *Botrytis cinerea* Pers. is a phytosanitary problem in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). It is characterized for affecting soft tissues (flowers and fruits) in the field and in the post-harvest stage, reducing crop yield. This has motivated to the search for native strains of *Trichoderma* that are effective in biological control. **Objective.** To determine the effect of 19 native *Trichoderma* strains on the control of gray mold on flowers and fruits of blueberry under laboratory conditions. **Methodology.** Under a complete randomized experimental design, mycoparasitism and antibiosis tests were carried out to evaluate colonization and mycelial inhibition of the pathogen, respectively, using the dual confrontation method and production of secondary metabolites. For the bioassays, a suspension of 1×10^6 conidia mL^{-1} per strain was sprayed on blueberry flowers and fruits. Disease incidence and severity were evaluated. Data were analyzed with the statistical program InfoStat. **Results.** All *Trichoderma* strains completely colonized the pathogen, being considered as aggressive mycoparasites and inhibited the mycelial growth of the pathogen up to 42.74%. Likewise, the application of *Trichoderma* spore suspension had inhibitory effects on gray mold, highlighting the strain HE- ArT161 that reduced the incidence (66.67% and 20%) and severity (34% and 12%), respectively in flowers and fruits. **Implications.** The use of these native strains of *Trichoderma* may contribute to future research in the field where they can be incorporated for an integrated management of the disease. **Conclusion.** These *Trichoderma* isolates against *B. cinerea* showed *in vitro* control, stimulating mycelial inhibition of the pathogen and reducing the development of disease lesions.

Key words: Antibiosis; biocontrol; mycelial growth; mycoparasitism; pathogen.

RESUMEN

Antecedentes. El moho gris causado por *Botrytis cinerea* Pers. es un problema fitosanitario en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). Se caracteriza por afectar tejidos blandos (flores y frutos) en campo y en la etapa de postcosecha, ocasionando una disminución en el rendimiento del cultivo. Esto ha llevado a buscar cepas nativas de *Trichoderma* que sean eficaces en el control biológico. **Objetivo.** Determinar el efecto de 19 cepas nativas de *Trichoderma* sobre el control del moho gris en flores y frutos de arándano en condiciones de laboratorio. **Metodología.** Bajo un diseño experimental completo al azar se realizaron pruebas de micoparasitismo y antibiosis para evaluar la colonización e inhibición micelial del patógeno, respectivamente, mediante el método de enfrentamiento dual y producción de caldos de cultivo con metabolitos secundarios. Para los bioensayos se asperjaron una suspensión de 1×10^6 conidios mL^{-1} por cada cepa sobre las flores y frutos de arándano. Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad. Los datos fueron analizados con el programa estadístico InfoStat. **Resultados.** Todas las cepas de *Trichoderma* colonizaron completamente al patógeno, considerándose como micoparásitos agresivos e inhibieron el crecimiento micelial del patógeno hasta un 42.74%. Asimismo, la aplicación de suspensión de esporas de *Trichoderma* tuvo efectos inhibitorios

[†] Submitted July 26, 2023 – Accepted October 15, 2024. <http://doi.org/10.56369/tsaes.5072>



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

ISSN: 1870-0462.

ORCID = Yasmin Carmen Arestegui-Cantoral: <http://orcid.org/0000-0001-8016-9161>; Eryka Gaslac-Zumaeta: <http://orcid.org/0000-0002-0804-3457>; Betsabe Leon-Ttacca: <http://orcid.org/0000-0002-4343-2431>

sobre el moho gris, destacando la cepa HE- ArT161 que redujo la incidencia (66.67% y 20%) y severidad (34% y 12 %), respectivamente en flores y frutos. **Implicaciones.** El uso de estas cepas nativas de *Trichoderma* puede contribuir a futuras investigaciones en campo que permitan incorporarlas a un manejo integrado de la enfermedad. **Conclusión.** Los aislados de *Trichoderma* frente a *B. cinerea* evidenciaron, *in vitro*, un control efectivo, estimulando la inhibición micelial del patógeno y la reducción del desarrollo de las lesiones de la enfermedad.

Palabras claves: Antibiosis; biocontrol; crecimiento micelial; micoparasitismo; patógeno.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, el arándano (*Vaccinium corymbosum* L., Ericaceae) es uno de los productos de mayor importancia y de demanda en los mercados internacionales como Estados Unidos de América, Países Bajos, Reino Unido y China, por su calidad y presencia durante todo el año, incrementándose la producción de este cultivo en las regiones de La Libertad, Ica y Lambayeque (Instituto Nacional de Estadística e Informática [INEI], 2023; Ministerio de Comercio Exterior y Turismo [MINCETUR], 2022). Sin embargo, una de las barreras fitosanitarias presente durante el proceso de producción es la enfermedad del moho gris (*Botrytis cinerea* Pers., Ascomycota, Sclerotiniaceae) que dificulta el manejo de este cultivo, considerado un serio problema debido a la alta incidencia de *B. cinerea* en campo y a la susceptibilidad de las variedades de arándano (Saito *et al.*, 2014).

El moho gris causado por *B. cinerea* es una amenaza principal del cultivo de arándano, el cual se reproduce con gran facilidad en un ambiente con alta humedad, causando necrosamiento en las flores y pudrición a nivel de los frutos. Esto impacta negativamente el rendimiento y la calidad del fruto, y por ende, los volúmenes de fruta a exportar, generando pérdidas tanto en campo como en postcosecha, llegando a deteriorar al producto final hasta un 20% (Agraria, 2022). En la actualidad, el método de control más empleado corresponde al uso de fungicidas, tales como azoxistrobin, difeconazoles, fluopiran, pirimetamil, boscalib, piroclostrobin, fenexamil, fludioxonil, propiconazole y ciprodin, cuyo uso continuo ha generado resistencia del patógeno, el incremento de las dosis y frecuencia en la aplicación de estos; en consecuencia, impactos negativos en el medio ambiente (Ortiz, 2019).

Es por ello que, en la búsqueda de nuevas alternativas, el género *Trichoderma* Persoon ex Gray, 1801 (Ascomycota, Hypocreaceae) merece una máxima atención debido a que posee una alta capacidad antagónica gracias a los múltiples mecanismos de acción, como la competencia por espacio, micoparasitismo y antibiosis implicadas en el proceso de biocontrol frente a diferentes patógenos. Gran parte de su efectividad se basa en la producción de metabolitos secundarios que le confieren al antagonista propiedades antifúngicas importantes (Stoppacher *et*

al. 2010). Esto hace que estos antagonistas sean una gran alternativa de control biológico y más amigable con el medio ambiente, disminuyendo el uso de agroquímicos que se emplean en los sistemas de producción convencional y lleva a una mejora de la calidad de los frutos sin restos químicos que puedan afectar la exportación del fruto fresco a mercados internacionales (Díaz *et al.*, 2022; Mesa *et al.*, 2020). El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de 19 cepas nativas de *Trichoderma* sobre el control del moho gris (*B. cinerea*) en flores y frutos de arándano (*V. corymbosum*) en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El trabajo de investigación se ejecutó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal ubicado en las instalaciones de la Universidad Nacional de Cañete (UNDC), sede CNI, en el distrito de Imperial, Cañete, Perú.

Aislamiento e identificación de *B. cinerea*

Caracterización morfológica

Las muestras enfermas de flores y frutos de arándano, con signos y síntomas del patógeno fueron colectadas del Fundo Proberries S.A. Éstas se colocaron en cajas plásticas para su traslado a laboratorio. El material colectado fue puesto en cámaras húmedas para inducir la esporulación. A las 48 horas, con ayuda del estereoscopio, se extrajeron estructuras del hongo para su siembra directa en tres puntos de placas Petri con medio de papa dextrosa agar (PDA). Se incubaron entre 7 y 10 días a aproximadamente 25 °C (Gómez *et al.*, 2013). Los aislamientos se evaluaron en función a sus características macro y microscópicas. Las características macroscópicas descritas fueron la forma y el color de la colonia. En las características microscópicas se describieron la forma del micelio, presencia, forma y color de conidióforos, estructura de las esporas y esclerocios.

Caracterización molecular

Se hizo una identificación molecular de 12 aislados, amplificando y secuenciando la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr, siguiendo los procedimientos de PCR

y secuenciación mediante el método Illumina, como lo describe Huamán-Pilco *et al.* (2023).

Las extracciones de ADN se llevaron a cabo a partir de cultivos asépticos, con el kit de extracción de ADN genómico Wizard® (Promega, Winconsin, EE. UU), el ADN fue medido con el Espectrofotómetro (BioSpectrometer® basic - Eppendorf, Nueva Jersey, EE. UU), y las concentraciones de ADN logradas se ajustaron a una concentración de 0.5 ng/μl antes del proceso de PCR. Se amplificó la región espaciadora transcrita interna "ITS" (ITS2, 5.8S y ITS1) del gen de ADNr (Toome *et al.*, 2013). Los productos fueron secuenciados por el método Sanger a través de una compañía externa.

Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas usando el software Sequencher v.5.4 (Gene Codes, EE). Las secuencias se alinearon con MUSCLE (Edgar, 2004), en el programa MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018). Posteriormente, las secuencias alineadas se analizaron en el portal Web CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller *et al.*, 2011) utilizando el algoritmo de Máxima Verosimilitud (Stamatakis, 2014). Por último, se visualizaron y editó el árbol filogenético en el software FigTree (Rambaut, 2006). Los análisis filogenéticos posibilitaron la identificación molecular de las cepas recolectadas.

Se emplearon 19 cepas de *Trichoderma*, endófitos de tallos, hojas y raíz de arándano, vid y papa provenientes de seis distritos de las provincias de Pisco (Región Ica), Cañete y Cajatambo de la región Lima. (Tabla 1). Estas fueron brindadas por el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la UNDC. Se reactivaron y multiplicaron en placas Petri con medio PDA e incubaron a 25 °C por 7 días (Cubilla *et al.*, 2019).

Ensayos para evaluar la capacidad antagónica de las cepas nativas de *Trichoderma* hacia *B. cinerea* *in vitro*

Los ensayos se condujeron mediante un diseño completamente al azar con tres repeticiones, donde se evaluó la capacidad antagónica frente a *B. cinerea* de 19 cepas nativas de *Trichoderma* (Tabla 1), más un tratamiento testigo, para conformar un total de 20 tratamientos. Se utilizó el método de enfrentamiento dual según la metodología propuesta por Pincay *et al.* (2020). Se realizaron cultivos duales de las cepas de *Trichoderma* y una cepa del patógeno en placas Petri de 90 × 15 mm, con medio PDA. Se transfirió un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada hongo en lados opuestos de las placas Petri; como testigo se sembró solo el patógeno de forma individual. Los cultivos se incubaron a 25 °C durante 7 días hasta que el testigo completó el crecimiento en toda la placa. Finalmente, se procedió a realizar las mediciones de cuatro radios del crecimiento de la colonia del patógeno, desde el disco de micelio hasta donde se detuvo el crecimiento.

Procedencia de cepas nativas de *Trichoderma*

Tabla 1. Procedencia de cepas nativas de *Trichoderma* utilizadas en el trabajo de investigación. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú, 2022.

N°	Cepa	Órgano	Lugar de origen (Distrito, Provincia y Región)
1	HE-ArR1	Raíz	Pisco, Pisco, Ica
2	HE-ArR3	Raíz	Pisco, Pisco, Ica
3	HE-ArR6	Raíz	Pisco, Pisco, Ica
4	HE-ArR7	Raíz	Pisco, Pisco, Ica
5	HE-ArT1	Tallo	N. Imperial, Cañete, Lima
6	HE-ArT91	Tallo	Roma, Cañete, Lima
7	HE-ArR92	Raíz	Roma, Cañete, Lima
8	HE- ArT161	Tallo	Pisco, Pisco, Ica
9	HE- ArT118	Tallo	Pisco, Pisco, Ica
10	HE- PaH6	Hoja	Gorgor, Cajatambo, Lima
11	HE- PaT7	Tallo	Gorgor, Cajatambo, Lima
12	HE- PaH13	Hoja	Gorgor, Cajatambo, Lima
13	HE- PaR1	Raíz	Gorgor, Cajatambo, Lima
14	HE- PaT5	Tallo	Gorgor, Cajatambo, Lima
15	HE- PaH15	Hoja	Gorgor, Cajatambo, Lima
16	HE- PaH12	Hoja	Gorgor, Cajatambo, Lima
17	HE-ViH29	Hoja	San Vicente, Cañete, Lima
18	HE-ViT24	Tallo	Hualcará, Cañete, Lima
19	HE-ViT28	Tallo	Hualcará, Cañete, Lima

Asimismo, se extrajeron metabolitos secundarios (MS) de las 19 cepas nativas de *Trichoderma*, según la metodología propuesta por Bailey *et al.* (2008). Se obtuvieron cultivos jóvenes de las cepas nativas y con un sacabocado de 0.25 cm, se extrajeron cinco discos de medio de cultivo con el hongo; éstos fueron puestos en tubos de ensayo para las diluciones y conteo de esporas. Luego se estandarizó el inóculo a una concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} . De esta suspensión de esporas, se inoculó 1 mL en matraces con 100 mL de medio líquido a base de caldo de papa y sacarosa (PSA), previamente esterilizados. Los matraces, ya inoculados con la suspensión de conidios, fueron puestos en un agitador orbital constante a 150 rpm durante 7 días. El sobrenadante fue filtrado hasta obtener un volumen de 40 mL, luego se centrifugó por cinco minutos a 3000 rpm y se sometió a baño María a 90 °C por una hora. Posteriormente, este caldo de MS fue mezclado con el medio de PDA (2% de agar) y transferido a placas Petri de 60 × 15 mm. En el centro de estas placas se colocó un disco de 5 mm de medio de cultivo con estructuras del patógeno (*B. cinerea*) y se incubó a 25 °C durante 3 días. La evaluación del efecto de antibiosis se realizó cuando el testigo completó su crecimiento micelial en toda la placa. Luego se realizó la medición del crecimiento radial del patógeno empleando un vernier digital.

Se determinó la inhibición micelial de *B. cinerea* con la ecuación utilizada por Baiyee *et al.* (2019): $\text{ICM}\% = (\text{CMC} - \text{CMT} / \text{CMC}) \times 100$, donde ICM: % inhibición del crecimiento micelial, CMC: crecimiento micelial del patógeno en el control (sin MS de *Trichoderma*) y CMT: crecimiento micelial del patógeno en el tratamiento con MS de *Trichoderma*.

Bioensayo para el control del moho gris (*B. cinerea*) en flores y frutos

Para este ensayo se emplearon sólo siete cepas de *Trichoderma*, lo que originó ocho tratamientos al

incluir al testigo. Se colectaron flores y frutos sanos de arándano del mismo campo de cultivo de donde se aisló el patógeno. Estos fueron llevados al laboratorio de Sanidad Vegetal y se seleccionaron 10 flores y 10 frutos para ser colocados directamente en placas Petri. Cada tratamiento estuvo compuesto por tres repeticiones (placas con flores y/o frutos). Asimismo, se preparó una suspensión de esporas de cada cepa de *Trichoderma* a una concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} con agua destilada estéril, más el adherente Trumex (0.25 mL.L^{-1}), para ser aplicados en todas las flores y frutos de arándano, humedeciéndolos por completo mediante atomizadores manuales, y luego dejándolos en cajas plásticas (cámara húmeda) e incubados a temperatura ambiente. Finalmente, se evaluaron los porcentajes de incidencia y de severidad de la enfermedad en función de las escalas correspondientes (Tablas 2 y 3); para el caso de las flores a los 7 días y en frutos a los 16 días, los cuales fueron calculados con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de flores o frutos afectados}}{\text{N}^\circ \text{ total de flores o frutos}} \times 100$$

$$\text{Severidad (\%)} = \frac{\sum (\text{Número de flores o frutos con infección} \times \text{número de grado})}{(\text{Número total de flores o frutos} \times 5)} \times 100$$

Tabla 2. Escala para determinar el grado de severidad del daño ocasionado por *Botrytis cinerea* en flores de arándano (*Vaccinium corymbosum*) (Martínez y Moreno, 2008).

Grado	Porcentaje de colonización y esporulación de <i>B. cinerea</i>
0	0%
1	<25%
2	25 – 50%
3	>50 – 100%
4	<50% esporulación
5	50 – 100% esporulación

Tabla 3. Escala para determinar el grado de severidad del daño ocasionado por *Botrytis cinerea* en frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum*) (Edquen, 2019).

Grado	Porcentaje de infección	Descripción
1	0%	Fruto aparentemente sano.
2	1 – 25%	Fruto mostrando maceración en 25% de su área.
3	26 – 50%	Fruto con lesión macerada, ocupando el 50%, tonalidad marrón claro.
4	51 – 75%	Fruto con 75% de maceración y deshidratación, liberación de jugo por la acción de las enzimas.
5	76 – 100%	Fruto macerado y deshidratado en 100% crecimiento micelial del patógeno.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como porcentajes de inhibición del crecimiento para el estudio de antibiosis, y de incidencia y severidad para el bioensayo. Todas las variables evaluadas cumplieron los supuestos de normalidad y heterocedasticidad, por lo que se les realizó un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Los análisis fueron realizados utilizando el software estadístico InfoStat, versión 2008 (Di Rienzo *et al.*, 2008).

RESULTADOS

Análisis morfológico y filogenético de *B. cinérea*

Los aislamientos trabajados en este estudio tenían características macro y micro que son consistentes con la especie *Botrytis cinérea* (Barnett y Hunter, 1998). mayor crecimiento micelial a temperaturas de 20 y 25°C colonizando las placas al cabo de 7 días; inicialmente, las colonias presentaban una consistencia algodonosa de color blanquecino tornándose color gris a gris oscuro. El micelio era septado, ramificado y liso, presentaba conidióforos largos y erectos de color marrón con una longitud de 400 y 650 μm , ramificados en el ápice con racimos de esporas. La estructura de las esporas era ovalada, globosa, lisa y sin color, con medidas del diámetro que oscilaban de 1.81 a 9.29 μm ; también, se tuvieron esclerocios de color negro con un diámetro de 1.33 a 3.03 mm (Chen *et al.*, 2021; Polat *et al.*, 2018; Ramos y Guillermo, 2021). Todas estas características morfológicas y culturales descritas por Barnett y Hunter (1998) permitieron identificar putativamente al hongo *B. cinerea*.

El análisis filogenético muestra, que los 12 aislados pertenecen a *B. cinérea*, comparamos a las cepas con las secuencias tipo relacionadas filogenéticamente de las especies del mismo taxón de acuerdo con la literatura (Zhang *et al.*, 2016, Ferrada *et al.*, 2016), obteniendo un porcentaje aceptable de soporte *Bootstrap*, dando soporte a la identificación morfológica. Las secuencias fueron depositadas en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), con números de accesos: (PP850067, PP850068, PP850069, PP850070, PP850071, PP850072, PP850073, PP850074, PP850075, PP850076, PP850077, PP850078).

Enfrentamiento dual de las cepas nativas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*

La confrontación de las 19 cepas de *Trichoderma* frente a *B. cinerea* tuvo un impacto positivo en el

porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial del patógeno, con valores entre 43.0 y 60.0%; sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p=0.0943$) entre las cepas, ya que la mayoría mostró efectos antagonistas, formando una zona de inhibición progresiva, e invadieron al patógeno debido a su rápido crecimiento. Las cepas HE- PaH13 y HE-ArR6 (60.14 y 57.65%) mostraron los mayores efectos en sus respectivos enfrentamientos. Asimismo, los cultivos duales tuvieron un periodo de enfrentamiento de entre 7 y 14 días, lo que permitió observar que las cepas nativas de *Trichoderma* colonizaron completamente al patógeno, considerándose así, como micoparásitos agresivos; esto se comprobó con el reaislamiento del patógeno, donde se observó que éste no creció de los discos reaislados (Figuras 1 y 2).

Producción por parte de las cepas nativa *Trichoderma* de sustancias inhibitoras del crecimiento micelial de *B. cinérea*

Las cepas nativas de *Trichoderma* variaron en su capacidad de producir sustancias que inhibieron el crecimiento micelial de *B. cinérea*, inhibición que osciló de 6.56 a 42.74% (Figura 2); asimismo, los tratamientos mostraron diferencias significativas entre ellos ($p \leq 0.0001$), de los cuales cinco evidenciaron inhibición micelial por encima del 30% (cepas HE-ArR7, HE- PaT7, HE-ArR1, HE-ArT161 y HE-ArR92). Todas estas cepas expresaron superioridad estadística sobre el resto de las cepas, las cuales tuvieron un menor efecto (por debajo de 20%). El patógeno mostró un crecimiento atípico, con poco crecimiento micelial y sin esporulación (Figura 3).

Efecto de la aplicación de *Trichoderma* en el control de *B. cinerea* en flores de arándano en condiciones de laboratorio

El experimento *in vivo* para el control de *B. cinerea* en flores de arándano mostró que la aplicación de suspensión de esporas de cepas de *Trichoderma* a una concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} inhibió el desarrollo de la enfermedad en las flores, con un control estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$). Cabe resaltar que los resultados de incidencia y severidad arrojaron un mejor control de la enfermedad cuando se aplicó la cepa HE- ArT161, la cual presentó valores del 66.6 y 34.00%, respectivamente, mostrando su capacidad de reducir la colonización y esporulación del patógeno (Figuras 4 y 5); le siguió en importancia la cepa HE-ArR92 la cual mostró un 83.33 y 42.67% de flores enfermas, y destaca la utilidad del empleo de estos antagonistas nativos.

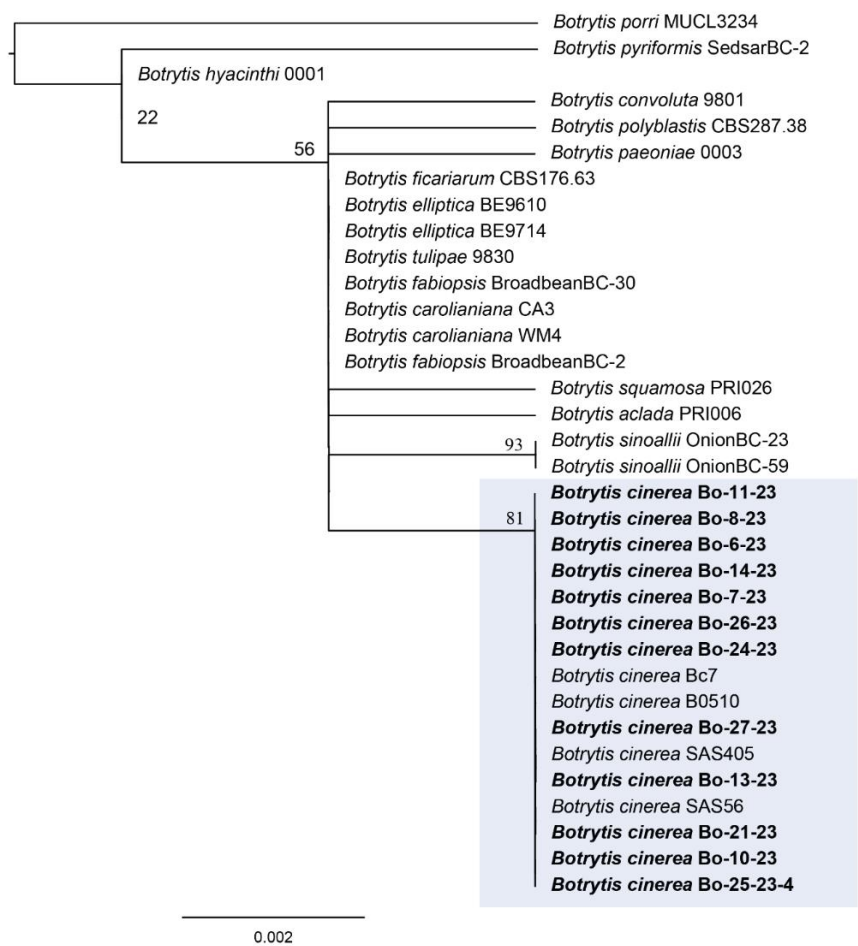


Figura 1. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con raíz de punto medio basado en el conjunto de datos de las secuencias ITS de los aislados obtenidos en este estudio. Estos aislados y su procedencia son representados en letras negritas.

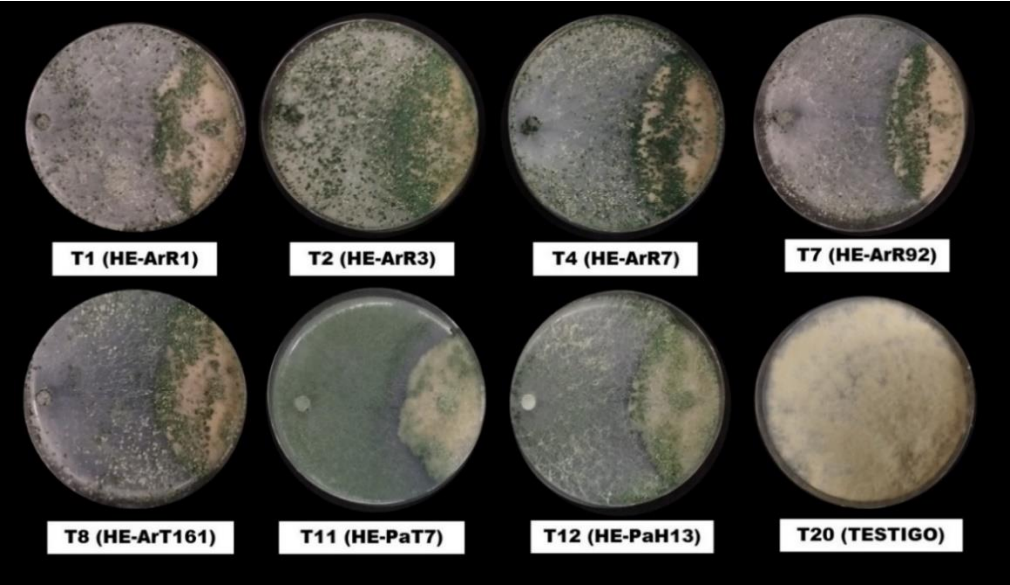


Figura 2. Efecto de las cepas nativas de *Trichoderma* frente a *Botrytis cinerea*, patógeno de arándano (*Vaccinium corymbosum*), mediante el método de placa dual a los 7 días de enfrentamiento. Se observa que las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento micelial y actuaron como micoparásitos de *B. cinerea*.

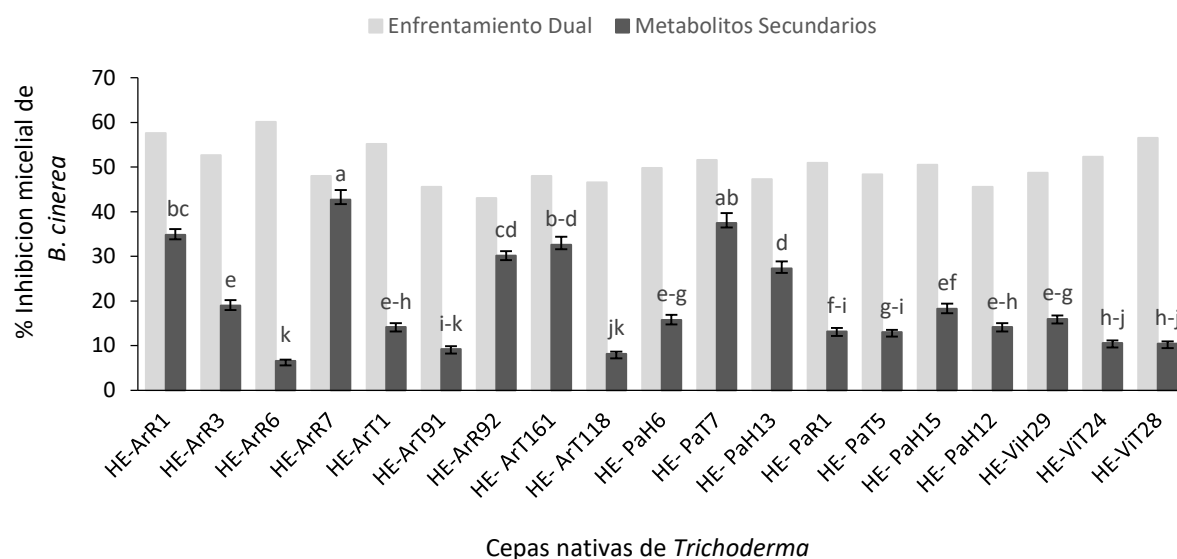


Figura 3. Efecto del enfrentamiento dual y MS de las cepas nativas de *Trichoderma* sobre la inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*. Columnas con letras o rango de letras diferente son estadísticamente diferentes entre sí, según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

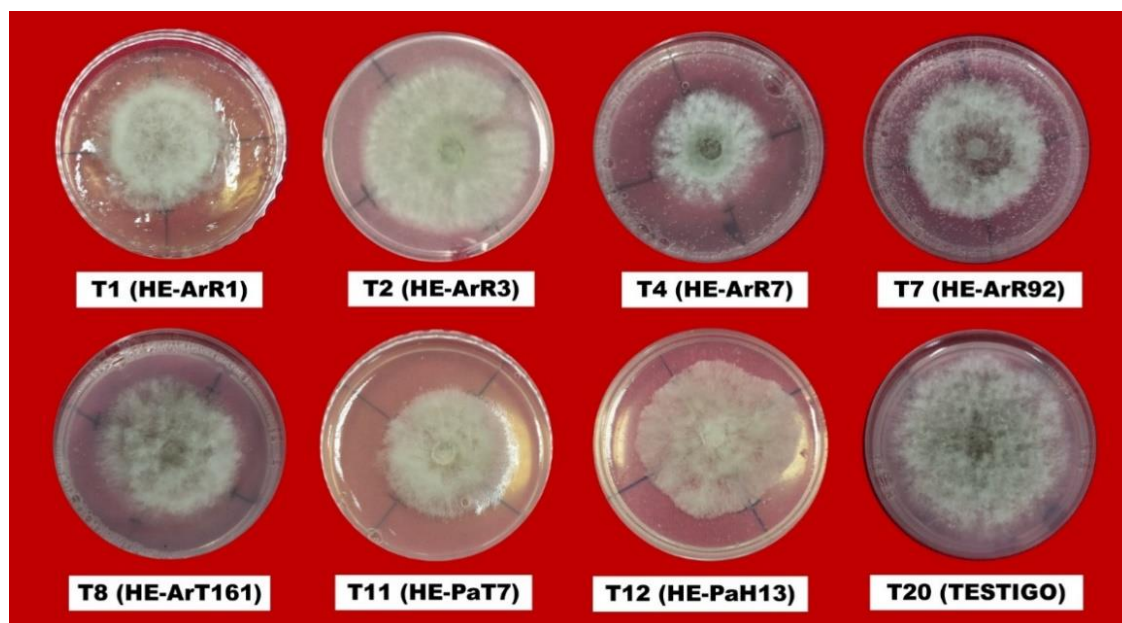
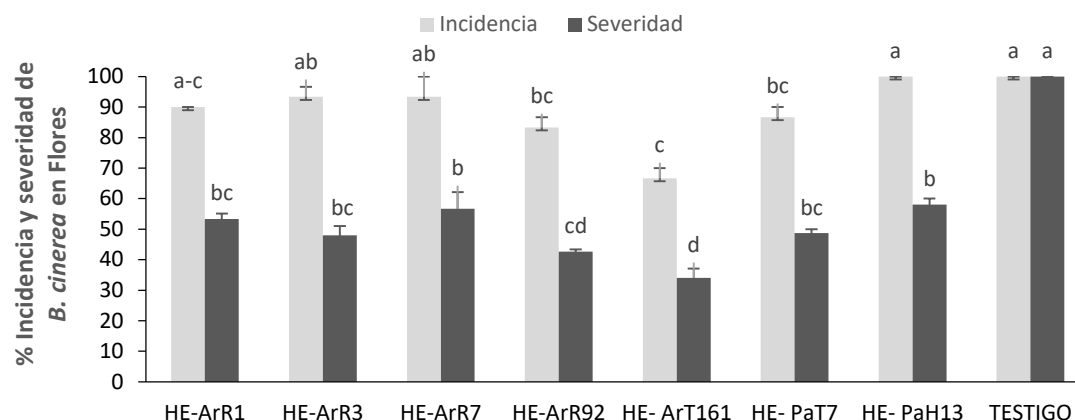


Figura 4. Inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* a los 3 días de inoculado el patógeno mediante el método de placas tratadas con MS de las cepas nativas de *Trichoderma*. Se observan las siete cepas de *Trichoderma* más sobresalientes con efecto antifúngico frente al patógeno.



Cepas nativas de *Trichoderma*

Figura 5. Incidencia y severidad de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* en flores de arándano tratadas con suspensión de esporas de cepas nativas de *Trichoderma* a una concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} . Columnas con letras o rango de letras diferente son estadísticamente diferentes entre sí según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

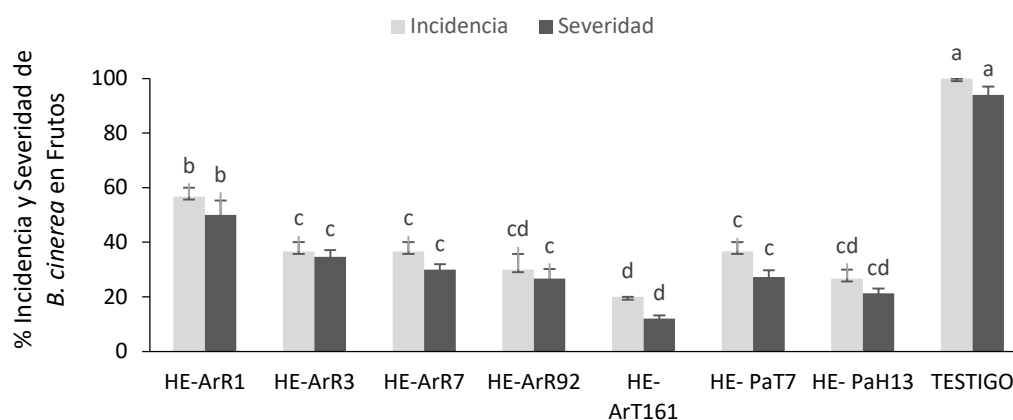


Figura 6. Incidencia y severidad del moho gris causado por *Botrytis cinerea* en flores de arándano tratadas con suspensión de esporas de cepas nativas de *Trichoderma* a una concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} . Se observa que la aplicación de la cepa HE-ArT161 condujo a la menor incidencia y severidad de la enfermedad, constituyéndose en el mejor tratamiento para su control, con un elevado efecto antifúngico.

Efecto de la aplicación de *Trichoderma* en el control de *B. cinerea* en frutos de arándano en condiciones de laboratorio

Las aplicaciones de cepas nativas de *Trichoderma* (1×10^6 conidios mL^{-1}) para el control del moho gris en frutos de arándano presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.0001$) entre las cepas, donde la incidencia de la enfermedad se redujo hasta un 20% con una severidad del 12% (Figuras 6 y 7), siendo la

cepa HE-ArT161 la que mayormente disminuyó el desarrollo de las lesiones de la enfermedad. Por otro lado, se puede observar que los demás tratamientos aplicados con las cepas HE-ArR92 y HE-PaH13 pudieron controlar a *B. cinerea* en ambos parámetros, donde la eficacia de las cepas de *Trichoderma* puede atribuirse a sus mecanismos de acción o propiedades antifúngicas ya que se retrasó el crecimiento del patógeno en los frutos en comparación con el testigo (100% en incidencia y 94% en severidad).



Cepas nativas de *Trichoderma*

Figura 7. Incidencia y severidad de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* en frutos de arándano tratados con suspensión de esporas de cepas nativas de *Trichoderma* a una concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} . Columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes entre sí según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).



Figura 8. Incidencia y severidad del moho gris causado por *Botrytis cinerea* en flores de arándano tratadas con suspensión de esporas de cepas nativas de *Trichoderma* a una concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} . Se puede observar que el efecto control de la cepa HE-ArT161, en comparación con las demás, redujo significativamente los síntomas de *B. cinerea*.

DISCUSIÓN

El análisis morfológico que se realizó en este estudio mostró que las cepas aisladas pertenecen a la especie *Botrytis cinerea*, lo cual se ve respaldado por el análisis filogenético realizado con el gen ITS. Similares análisis filogenéticos realizaron Zhang *et al.* (2016) y Ferrada *et al.* (2016), a diferencia que en dichos estudios amplificaron más de un gen, por lo cual su porcentaje de identidad fue relativamente más significativo. Sin embargo, en este estudio se amplificó el gen universal ITS, considerado como el código de barras estándar para la identificación de hongos

(Quijada *et al.*, 1997), demostrando que los aislados trabajados en este estudio son idénticos a la especie tipo de *Botrytis cinerea*.

Las cepas de *Trichoderma* estudiadas variaron en sus capacidades para producir metabolitos que inhiben el crecimiento micelial del patógeno. Por ejemplo, la prueba de antibiosis permitió conocer que las cepas HE-ArR7 y HE-PaT7 tuvieron un efecto inhibitorio sobresaliente, lo cual concuerda con lo descrito por Naeimi y Zaré (2013), quienes concluyeron que el crecimiento micelial de *B. cinerea* se vio significativamente ralentizado por los MS de *Trichoderma* spp. hasta en un 55 %. Otras cepas, en

cambio, tuvieron un comportamiento poco efectivo. De las 19 estudiadas, 13 cepas mostraron escasa inhibición del crecimiento del patógeno (menor al 20%), posiblemente asociada a una baja producción de MS. El éxito de *Trichoderma* como agente de biocontrol se debe, al menos en parte, a la capacidad de estos hongos para producir una gran cantidad de MS. En su estudio para identificar los compuestos químicos presentes diferentes cepas de *Trichoderma*, Martínez *et al.* (2018) determinaron que los mismos variaban según el lugar de recolección y la especie del hongo.

El efecto antagónico del género *Trichoderma* contra otros hongos ha sido abundantemente documentado en la literatura. Este género tiene la capacidad para producir sustancias antifúngicas, parasitar a otros hongos y competir con patógenos asociados a las plantas (Asad, 2022; Contreras *et al.*, 2016; Olowe *et al.*, 2022). Ello se debe a que producen una variedad de MS tales como péptidos no ribosomales, terpenoides, pironas y derivados indólicos (Contreras *et al.*, 2022), sin incluir otros de reciente descubrimiento (Huang *et al.*, 2024). Por su parte, Khan *et al.* (2020) indican que varias especies de *Trichoderma* son los productores más notables de MS con actividad antifúngica sobre fitopatógenos.

El efecto beneficioso de *Trichoderma* se manifiesta mediante diferentes mecanismos de acción, como es la producción de compuestos antifúngicos (metabolitos secundarios), micoparasitismo, competencia e inducción de resistencia contra los patógenos, además de actuar como promotor del crecimiento de las plantas. Por ejemplo, Bello *et al.* (2022) observaron que los compuestos secundarios producidos por una cepa de *Trichoderma* fueron eficaces en la inhibición del crecimiento de *B. cinerea*; este compuesto había sido identificados por Jin *et al.* (2020) como 6-pentil- α -pirona (6PP), el metabolito antifúngico más activo en el filtrado de la cepa. Zeilinger *et al.* (2016) señalaron que existen pruebas tanto directas como indirectas que respaldan la participación de diversos compuestos en la actividad antagónica de *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos debido a la presencia de un gran número de metabolitos.

Algunas de las cepas de *Trichoderma* estudiadas en esta investigación fueron micoparásitos agresivos que colonizaron completamente el micelio de *B. cinerea* (Figura 1) hasta el punto de que el patógeno no pudo recuperarse. De forma similar, Zeilinger *et al.* (2016) mencionan casos de micoparasitismo en las especies *T. virens* (J.H.Mill., Giddens & A.A.Foster) Arx (Ascomycota, Hypocreaceae) y *T. harzianum* Rifai (Ascomycota, Hypocreaceae) en el biocontrol de *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans, Stalpers, Samson & Benny (Basidiomycota, Marasmiaceae). Otros casos de micoparasitismo actividades antifúngicas son

documentados por Druzhinina *et al.* (2011), Vargas *et al.* (2014) y Xiao *et al.* (2006).

Además de ser micoparásitos, varias especies de *Trichoderma* se asocian a raíces de plantas con las que pueden establecer interacciones robustas y duraderas que le confieren resistencia al cultivo (Mazzei *et al.*, 2016). De igual forma, aislados de *T. harzianum*, *T. hamatum* y *T. asperellum* han demostrado ser efectivos para inducir resistencia a enfermedades en muchas especies de plantas (Yedidia *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004; Horst *et al.*, 2005).

Como promotor del crecimiento, se ha comprobado que *T. harzianum* estimula y mejora el crecimiento de las plantas, lo que puede significar un posible aumento en los rendimientos y calidad de la cosecha (Contreras *et al.*, 2024). También, hay ejemplos con otras especies como es el caso de *T. asperellum* en tomate (Kaissoumi *et al.*, 2024) y *Trichoderma* spp. en lechuga (Pereira *et al.*, 2019).

Hammad *et al.* (2021) realizaron experimentos de biocontrol utilizando filtrados de *T. atroviride* P.Karst. (TAtC11) (Ascomycota, Hypocreaceae) y *T. brevicompactum* (TBS1) y encontraron que éstos tenían una elevada actividad antagonista frente a *B. cinerea*, inhibiendo tanto el crecimiento micelial como la germinación de conidios del patógeno. De igual modo, Bello *et al.* (2022) observaron que el metabolito secundario producidos por *T. atroviride* IC-11 y conocido como 6PP fue eficaz en la reducción de la incidencia del moho gris en frutos de arándano e inhibición del crecimiento de *B. cinerea*, provocando cambios morfológicos, daños en la pared celular, deterioro de las hifas y una menor germinación conidial del patógeno.

Por su parte, Bae *et al.* (2016) observaron mediante pruebas de antibiosis que los metabolitos extraídos de cepas de *T. atroviride* y *T. petersenii* Samuels, Dodd & Schroers (Ascomycota, Hypocreaceae) mostraron una fuerte actividad antagónica contra *Phytophthora* sp. (Oomycota, Peronosporaceae) en hojas de tomate y pimiento provocando cambios morfológicos drásticos en el micelio, como hinchazón, arrugamiento, estallido, necrosis, esporulación, alteración de la expresión génica del patógeno y pérdida de la integridad de la pared celular, demostrando la capacidad de los metabolitos como agentes de biocontrol. Igualmente, Bailey *et al.* (2008) reportaron que los filtrados extraídos de cepas de *Trichoderma* inhibieron hasta en 50% el crecimiento hifal de *M. roreri* en plantas de cacao. De forma similar, Baiyee *et al.* (2019) encontraron que los filtrados secundarios de la cepa *T. spirale* Bisset T76-1 (Ascomycota, Hypocreaceae) inhibieron el crecimiento de *Corynespora cassiicola* (Berk & Curtis) Wei (Ascomycota, Corynesporascaceae) y *Curvularia*

aeria (Bat., J.A.Lima & C.T.Vasconc.) Tsuda (Ascomycota, Pleosporaceae) en aproximadamente 42% debido a la producción de alcoholes (etanol) y pirano (6PP).

Lo anterior sugiere que los efectos significativos sobre la incidencia y severidad del moho gris en flores y frutos de arándano observados en nuestro estudio podrían atribuirse a la presencia de compuestos volátiles y no volátiles existentes en las cepas de *Trichoderma* que habrían permitido contrarrestar el avance de la enfermedad. Jin *et al.* (2020) analizaron el mecanismo de acción de *T. atroviride* (T2) con el uso de MS contra *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten (Ascomycota, Nectriaceae), identificándose a 6PP como el metabolito antifúngico más activo en el filtrado de la cepa que indujo la autofagia y la alteración de los procesos metabólicos del patógeno. Se deduce, entonces, que la utilización de compuestos secundarios de *Trichoderma* (epipolítodioxopiperazinas, peptaiboles, pirona, butenólidos, piridonas, azafilonas, konigininas, esteroides, antraquinonas, lactona y tricotecenos) son una herramienta eficiente contra una gran variedad de patógenos que impactan de manera negativa a la agricultura (Khan *et al.*, 2020).

Kottb *et al.* (2015) mencionan que la aplicación del compuesto antifúngico 6PP de *T. asperellum* (IsmT5) en *Arabidopsis thaliana* Heynh redujo significativamente los síntomas producidos por *B. cinerea* y *Alternaria brassicicola* (hasta en 40 y 60%), induciendo a la disminución de germinación de esporas, resistencia y defensa a los hongos fitopatógenos. Por su parte, Rajani *et al.* (2021) revelaron la presencia de MS de las cepas de *Trichoderma* como alcoholes, éteres, hidrocarburos, aldehídos, ésteres, cetonas, ácidos y otros compuestos que poseían una actividad antifúngica frente *Sclerotium rolfii* y *Fusarium oxysporum*, afectando el crecimiento micelial y cambios morfológicos de los patógenos. Sridharan *et al.* (2020) hallaron que el aislado *T. longibrachiatum* (EF5) impidió el desarrollo del micelio y esclerocios de *S. rolfii* (68%) y *Macrophomina phaseolina* (33%), comprobando así que los compuestos obtenidos e identificados actúan de forma fungistática. También, Zhang *et al.* (2018) reportaron a *T. longibrachiatum* como un agente de biocontrol por su amplia gama de sustancias químicas antifúngicas que inhibieron el crecimiento de *Valsa mali*, un hongo patógeno del manzano.

Barakat y Al Masri (2017) estudiaron los efectos de una fórmula biofungicida de *T. harzianum* sobre el moho gris (*B. cinerea*) en hojas y plantas enteras de fresa y observaron una reducción significativa de la incidencia y severidad de la enfermedad, la cual se correlacionó positivamente con el aumento de la concentración de esporas empleada. Asimismo, Baiyee

et al. (2019) revelaron que la aplicación de suspensión de esporas de *T. spirale* (T76-1) redujo la severidad de la mancha foliar por *Corynespora cassiicola* y *C. aeria* en plántulas de lechuga hasta aproximadamente 60%. Del mismo modo, Geng *et al.* (2022) demostraron el efecto control de la concentración de esporas de *T. harzianum* sobre el moho gris en plantas de tomate, donde disminuyeron significativamente las lesiones causadas por *B. cinerea* en las hojas de la planta.

Pascale *et al.* (2017) aplicaron una concentración de esporas del aislado *T. harzianum* (T22) que resultó efectiva en reducir la severidad del patógeno *Uncinula necator* (Schwein.) Burrill en plantas de vid. Por su parte, Limdolphamand *et al.* (2023) emplearon una formulación fresca y seca de *Trichoderma* spp. para controlar el tizón de la hoja del maíz, y encontraron una eficacia biocontroladora al reducir la severidad de la enfermedad hasta en 56%, debido a la alta competencia por el espacio, los nutrientes y la producción de compuestos antifúngicos, sobresaliendo la formulación fresca en comparación con la seca.

Entre las limitaciones del presente estudio es pertinente señalar que los objetivos no incluyeron la identificación de las sustancias químicas, o metabolitos secundarios, existentes en los caldos de cultivo, y que fueron extraídos de las cepas de *Trichoderma* mediante el método descrito por Bailey *et al.* (2008). Esto representa un objetivo particular que podrá contemplarse en futuras investigaciones. No obstante, el estudio demostró que la presencia de estas sustancias químicas definitivamente ocasionó la inhibición del crecimiento micelial del patógeno.

CONCLUSIONES

Las cepas HE-ArR7, HE- PaT7, HE-ArR1 y HE-ArT161 fueron micoparásitos agresivos y produjeron metabolitos que inhibieron el crecimiento de *B. cinerea*. Además, con la aplicación de esporas de la cepa HE- ArT161 se obtuvo la menor incidencia y severidad de la enfermedad en flores y frutos de arándano.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Universidad Nacional de Cañete, quien financió la ejecución total de este trabajo de investigación mediante el Concurso de Subvención de Proyecto de Tesis 2022.

Funding. Funded by Universidad Nacional de Cañete (UNDC), within the thesis project: “Cepas nativas de *Trichoderma* para el control In vitro del moho gris (*Botrytis cinerea*) de arándano (*Vaccinium corymbosum* L).”

Conflict of interests. Nothing to declare.

Compliance with ethical standards. Do not apply.

Data availability. Dataset and related information can be obtained from aresteguiyc@gmail.com upon reasonable request.

Author contribution statement (CRediT).

Y.C. Arestegui-Cantoral - Funding acquisition, investigation, conceptualization, formal analysis, writing—original draft preparation; **E. Gaslac-Zumaeta** – Investigation, formal analysis, writing-review and editing; **B. León-Ttacca** – Formal analysis, methodology, supervision, project administration, visualization, writing-review and editing.

REFERENCES

- Agraria., 2022. *Botrytis cinerea*; la prevención es la clave del éxito. <https://agraria.pe/noticias/botrytis-cinerea-la-prevencion-es-la-clave-del-exito-27734> (17 de diciembre 2023).
- Asad, S.A., 2022. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review. *Ecological Complexity*, 49, p.100978. <https://doi.org/10.1016/J.ECOCOM.2021.100978>
- Bae, S.J., Mohanta, T.K., Chung, J.Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S., Hong, S.B., Seo, H., Bae, D. W., Bae, I., Kim, J.J. and Bae, H., 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control*, 92, pp. 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>
- Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Crozier, J., Thomas, S.E., Samuels, G.J., Vinyard, B.T. and Holmes, K.A., 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46(1), pp. 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>
- Baiyee, B., Pornsuriya, C., Ito, S. ichi and Sunpapao, A., 2019. *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassicola* or *Curvularia aeria*. *Biological Control*, 129, pp. 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.018>
- Barakat, R.M. and Al Masri, M.I., 2017. Effect of *Trichoderma harzianum* in combination with fungicides in controlling gray mould disease (*Botrytis cinerea*) of strawberry. *American Journal of Plant Sciences*, 8(4), pp. 651–665. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.84045>
- Bello, F., Montironi, I.D., Medina, M.B., Munitz, M.S., Ferreira, F.V., Williman, C., Vázquez, D., Cariddi, L.N. and 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, pp. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104040>
- Contreras, H., Macías, L., Larsen, J. and Del Val, E., 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), pp. 1–17. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>
- Contreras-Cornejo, H.A., Orozco-Granados, O., Ramírez-Ordorica, A., García-Juárez, P., López-Bucio, J. and Macías-Rodríguez, L., 2022. Light and mycelial injury influences the volatile and non-volatile metabolites and the biocontrol properties of *Trichoderma atroviride*. *Rhizosphere*, 22, p.100511. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100511>
- Contreras-Cornejo, H. A., Schmoll, M., Esquivel-Ayala, B. A., González-Esquivel, C. E., Rocha-Ramírez, V. and Larsen, J., 2024. Mechanisms for plant growth promotion activated by *Trichoderma* in natural and managed terrestrial ecosystem. *Microbiological Research*, 281, p.127621. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127621>
- Cubilla Ríos, A.A., Ruíz Díaz, D.D., Romero Rodríguez, M.C., Flores Giubi, M.E. and Barúa Chamorro, J.E., 2019. Antibiosis of proteins and metabolites of three species of *Trichoderma* against paraguayian isolates of *Macrophomina phaseolina*. *Agronomy Mesoamerican*, 30(1), pp. 63–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>
- Chen, J., Zi, J., Gang, X., Guo, A., Tou, S. and Zhong, J., 2021. *Botrytis cinerea* causing gray mold of *Polygonatum sibiricum* (Huang Jing) in China. *Crop Protection*, 140, p.105424. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105424>

- Díaz García, E., Valenzuela Quintana, A., Troncoso Rojas, R., Gonzalez Mendoza, D. and Tiznado Hernández, M. 2022. Metabolitos bioactivos de *Trichoderma* para el control de hongos postcosecha en frutas y hortalizas. In: L.C. Montoya Ballesteros, M.E. Tiznado Hernandez, T.J. Madera Santana, J.F. Ayala Zavala, G.A. González Aguilar, eds. *Tecnología, Ingeniería y Biotecnología de Alimentos de Origen Vegetal: Aprovechamiento de sus Subproductos*. CDMX:LIBERMEX-CIAD. Pp. 227–243.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. and Robledo, C.W., 2008. *InfoStat software estadístico, Manual del Usuario: Vol. Grupo Infostad (1.1)*. Universidad Nacional de Córdoba. <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=34>
- 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. and Kubicek, C.P., 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9, pp. 749–759.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), p.1792. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH340>
- Edquen Q., M.N., 2019. Fungosis de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) var. Biloxi en el Distrito de Jesús - Cajamarca. Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Cajamarca. <http://hdl.handle.net/20.500.14074/3242>
- Geng, L., Fu, Y., Peng, X., Yang, Z., Zhang, M., Song, Z. and Ahammed, J., 2022. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Biological Control*, 174, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105019>
- Ferrada, E.E., Latorre, B.A., Zoffoli, J.P. and Castillo, A., 2016. Identification and characterization of botrytis blossom blight of Japanese plums caused by *Botrytis cinerea* and *B. prunorum* sp. nov. in Chile. *Phytopathology*, 106(2), 155–165. https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-15-0143-R/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-06-15-0143-R_F6.JPEG
- Gómez Ramírez, H., Soberanis Ramirez, W., Tenorio Cantoral, M. and Torres Del Aguila, E., 2013. *Manual de producción y uso de hongos antagonistas*. Ministerio de Agricultura, Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Dirección de Sanidad Vegetal, Perú. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2017/09/Manual-de-Producci%C3%83%C2%B3n-y-Uso-de-Hongos-Antagonistas.pdf>
- Hammad, M., Guillemette, T., Alem, M., Bastide, F. and 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. *Biological Pest Control*, 31(85), pp. 2–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s41938-021-00423-4>
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A. and Chet, I., 2004. *Trichoderma* spp.—opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*, 2, pp. 43–56. <http://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Horst, L.E., Locke, J., Krause, C.R., McMahon, R.W., Madden, L.V. and Hoitink, H.A.J., 2005. Suppression of *Botrytis* blight of begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost-amended potting mixes. *Plant Disease*, 89, pp. 1195–1200. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1195>
- Huaman-Pilco, A.F., Torres-de la Cruz, M., Aime, M.C., Leiva-Espinoza, S.T., Oliva-Cruz, S.M. and Díaz-Valderrama, J.R., 2023. First report of thread blight caused by *Marasmius tenuissimus* on cacao (*Theobroma cacao*) in Peru. *Plant Disease*, 107(1), 219. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-22-0420-PDN>
- Huang, L., Liu, M.D., Hu, Y.W., Chen, L.J., Deng, Y., Gu, Y.C., Bian, Q., Le Guo, D. and Wang, G.Z., 2024. Secondary metabolites isolated from *Trichoderma hamatum* b-3 and their fungicidal activity. *Fitoterapia*, 174, p.105880. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2024.105880>
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática), 2023. *Producción de arándano alcanzó 42 mil 40 toneladas en noviembre del año 2022*. Nota de prensa INEI, Perú. <https://m.inei.gob.pe/prensa/noticias/produccion-de-arandano-alcanzo-42-mil-40-toneladas-en-noviembre-del-ano-2022->

- [14170/#:~:text=Durante%20noviembre%20del%20a%C3%B1o%202022,conocer%20el%20Instituto%20Nacional%20de /](#)
- Jin, X., Guo, L., Jin, B., Zhu, S., Mei, X., Wu, J. and Liu, T., 2020. Inhibitory mechanism of 6-Pentyl-2H-pyran-2-one secreted by *Trichoderma atroviride* T2 against *Cylindrocarpon destructans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, p.104683. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104683>
- Kaissoumi, H.E., Berbera, F., Mouden, N., Chahdi, A., Touhami, A.O., Selmaoui, K., Benkirane, R. and Douira, A., 2024. Tomato growth promotion by *Trichoderma asperellum* laboratory-made bioproduct. In: Sustainable and Green Technologies for Water and Environmental Management. Cham: Springer Nature Switzerland. pp.161-171.
- Khan, R.A.A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B. and Li, Y., 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. *Microorganisms*, 8(6), pp.817. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>
- Kottb, M., Gigolashvili, T., Großkinsky, D. K. and Piechulla, B., 2015. *Trichoderma* volatiles effecting arabidopsis: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 6(995), pp.156172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00995>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), pp.1547. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY096>
- Limdolphamand, S., Songkumarn, P., Suwannarat, S., Jantasorn, A. and Dethoup, T., 2023. Biocontrol efficacy of endophytic *Trichoderma* spp. in fresh and dry powder formulations in controlling northern corn leaf blight in sweet corn. *Biological Control*, 181, p.105217. <https://doi.org/10.1016/J.biocontrol.2023.105217>
- Martínez, M. and Moreno, Z., 2008. Estandarización de una metodología para la evaluación de eficacia de productos para la protección de cultivo (PPC) preventivos para el control de *Botrytis* sp., en condiciones semicontroladas. Tesis de Postgrado, Pontificia Universidad Javanica. <http://hdl.handle.net/10554/8532>
- Martínez Padrón, H.Y., Torres Castillo, J.A., Rodríguez Herrera, R., López Santillán, J.A., Estrada Drouaillet, B. and 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), pp. 1162–1171. <https://doi.org/10.5897/ajb2018.16546>
- Mazzei, P., Vinale, F., Woo, S.L., Pascale, A., Lorito, M. and Piccolo, A., 2016. Metabolomics by H-HRMAS-NMR of tomato plants treated with two secondary metabolites isolated from *Trichoderma*. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 64, pp.3538-3545. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00801>
- Mesa Vanegas, A.M., Calle Osorno, J. and Marín Pavas, D.A., 2020. Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), pp. 32–44. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. and Schwartz, T., 2011. The CIPRES science gateway: A community resource for phylogenetic analyses. TG'11: *Proceedings of the TeraGrid 2011 Conference: Extreme Digital Discovery*, Article No. 41. <https://doi.org/10.1145/2016741.2016785>
- MINCETUR (Ministerio de Comercio Exterior y Turismo), 2022. El arándano se posiciona como el principal producto de agroexportación nacional en los últimos doce meses - Noticias - Ministerio de Comercio Exterior y Turismo - Plataforma del Estado Peruano. <https://n9.cl/8jw6z>
- Naeimi, S. and Zaré, R. 2013. Evaluation of indigenous *Trichoderma* spp. isolates in biological control of *Botrytis cinerea*, the causal agent of strawberry gray mold disease. *BioControl in Plant Protection*, 1(2), pp. 55–74. <https://doi.org/10.22092/BCPP.2013.100609>
- Olowe, O.M., Nicola, L., Asemoloye, M.D., Akanmu, A.O. and Babalola, O.O., 2022. *Trichoderma*: Potential bio-resource for the management of tomato root rot diseases in Africa. *Microbiological Research*, 257, p.126978.

- <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2022.126978>
- Ortiz, M., 2019. *Enfermedades y plagas ponen a prueba a los arandaneros*. Redagícola Perú. <https://www.redagricola.com.pe/enfermedades-y-plagas-ponen-a-prueba-a-los-arandaneros/>
- Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., Marra, R., Lombardi, N., Woo, S.L. and Lorito, M., 2017. *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Protection*, 92, pp. 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.010>
- Pereira, F.T., Oliveira, J.B. D., Muniz, P.H.P., Peixoto, G.H.S., Guimarães, R.R. and Carvalho, D.D.C., 2019. Growth promotion and productivity of lettuce using *Trichoderma* spp. commercial strains. *Horticultura Brasileira*, 37(1), pp. 69–74. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620190111>
- Pincay, A., Viera, W., León, A., Noboa, M., Herrera, K. and Jackson, T., 2020. Evaluación *in vitro* del potencial antagonista de *Trichoderma* sp. y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus* Benth.) para el control de *Botrytis cinerea*. *Science and Research*, 6(1), pp. 109–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.4917695>
- Polat, İ., Baysal, Ö., Mercati, F., Gümrükcü, E., Sülü, G., Kitapç, A., Araniti, F. and Carimi, F., 2018. Infection, genetics and evolution characterization of *Botrytis cinerea* isolates collected on pepper in Southern Turkey by using molecular markers, fungicide resistance genes and virulence assay. *Infection, Genetics and Evolution*, 60, pp. 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.019>
- Quijada, A., Méndez-Cárdenas, G., Hernández-Baños, B. and Álvarez-Buylla, E., 1997. La región de los ITS del ADN ribosomal del núcleo (nrADN), fuente de caracteres moleculares en la sistemática de las gimnospermas. *Botanical Sciences*, 60, pp.159–168. <https://doi.org/10.17129/BOTSCI.1527>
- Rambaut, A., 2006. FigTree. *Institute of Evolutionary Biology, Univ. of Edinburgh*. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Ramos, S. and Guillermo, L., 2021. Main diseases in postharvest blueberries, conventional and eco-friendly control methods. A review. *LWT Food Science and Technology*, 149, pp. 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112046>
- Rajani, P., Rajasekaran, C., Vasanthakumari, M.M., Olsson, S.B., Ravikanth, G. and Shaanker, R.U., 2021. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 242, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126595>
- Saito, S., Michailides, T.J. and Xiao, C.L. 2014. First report of *Botrytis pseudocinerea* causing gray mold on blueberry in North America. *Plant Disease*, 98(12), p.1743. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0573-PDN>
- Sridharan, A.P., Thankappan, S., Karthikeyan, G. and Uthandi, S., 2020. Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Microbiological Research*, 236, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126436>
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), p.1312. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU033>
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R. and Schuhmacher, R., 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GCMS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), pp. 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.011>
- Toome, M., Aime, C.M. and Roberson, R.W., 2013. *Meredithblackwellia eburnea* gen. et sp. nov., Kriegeriaceae fam. nov. and Kriegeriales ord. nov.—toward resolving higher-level classification in Microbotryomycetes. *Mycologia*, 105(2), p. 486–495. <https://doi.org/10.3852/12-251>
- Vargas, A., Mukherjee, P.K., Laughlin, D., Wiest, A., Moran-Diez, M.E. and Kenerley, C.M., 2014. Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. *Microbiology*, 160, pp. 2319–2330. <https://doi.org/10.1099/mic.0.079210-0>

- Xiao-Yan, Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S. and Yu-Zhong, Z., 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 260, pp. 119-125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00316.x>
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. and Chet, I., 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. Lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp. 7342–7353. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7343-7353.2003>
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R. and Mukherjee, P.K., 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* e Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30(2), pp. 74–90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>
- Zhang, S., Xu, B., Zhang, J. and Gan, Y., 2018. Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 147, pp. 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.006>
- Zhang, J., Yang, H., Yu, Q.Y., Wu, M.D., Yang, L., Zhuang, W.Y., Chen, W.D. and Li, G.Q., 2016. *Botrytis pyriformis* sp. nov., a novel and likely saprophytic species of *Botrytis*. *Mycologia*, 108(4), 682–696. <https://doi.org/10.3852/15-340>