

Evaluación *in vitro* del potencial antagonista de *Trichoderma* sp. y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus* Benth) para el control de *Botrytis cinerea*

Trichoderma sp. and endophyte fungi of blackberry (*Rubus glaucus* Benth) for the control of *Botrytis cinerea*

AUTORES: Ana Pincay^{1,2}

Michelle Noboa²

William Viera^{1*}

Karen Herrera³

Antonio León³

Trevor Jackson⁴

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA: william.viera@iniap.gob.ec

Fecha de recepción: 01 / 07 / 2020

Fecha de aceptación: 24 / 11 / 2020

RESUMEN

Uno de los principales problemas fitosanitarios en los cultivos de mora (*Rubus glaucus* Benth) del Ecuador es el hongo *Botrytis cinerea* causante de la enfermedad del “moho gris”. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad antagónica de cuatro hongos frente al patógeno *B. cinerea*. Para llevar a cabo esta investigación se aislaron dos microorganismos endófitos del cultivo de mora (*Clonostachys* sp. y *Alternaria* sp.) y se utilizaron aislados de

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Av. Eloy Alfaro N30-350 y Amazonas, Quito, Ecuador.

² Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Av. 12 de Octubre, Quito, Ecuador.

³ Universidad San Francisco de Quito, Diego de Robles y Vía Interoceánica, 593 2 2971700 Cumbayá, Ecuador.

⁴ AgResearch, 1365 Springs Rd, Lincoln 7674, Christchurch, New Zealand.

Trichoderma asperellum y *Trichoderma* sp. de la colección de INIAP. Se utilizó la técnica de cultivos duales. Se utilizó la escala de Bell para evaluar el antagonismo y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial para el efecto antagónico. *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. alcanzaron el grado I en la escala de Bell, donde el antagonista inhibió el crecimiento de *B. cinerea* en un 75.1% y 73.7% respectivamente; mientras que el aislado de *Clonostachys* sp. alcanzó el grado II y se observó que sus esporas parasitaron los esclerocios de *B. cinerea*. Por otro lado, el aislado de *Alternaria* sp. se ubicó en grado III, lo cual no se consideró eficiente para inhibir el crecimiento del hongo patógeno.

Palabras clave: Biocontrol, *Clonostachys*, endófito, moho gris, antagonista.

ABSTRACT.

One of the main phytosanitary problems in blackberry (*Rubus glaucus* Benth) crops in Ecuador is the fungus *Botrytis cinerea* that causes gray mold disease. The objective of this study was to determine the antagonistic capacity of four fungi against the pathogen *B. cinerea*. To carry out this research, two endophytic blackberry microorganisms were isolated (*Clonostachys* sp. and *Alternaria* sp.) and strains of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma* sp. belonging to the INIAP's collection were used. The dual culture technique was used. The Bell scale was used to assess antagonism and the percentage of inhibition of mycelial growth was calculated for the antagonistic effect. *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. grade I on the Bell scale, where the antagonist fungus inhibited the growth of *B. cinerea* by 75.1% and 73.7% respectively; while the isolate of *Clonostachys* sp. obtained grade II and despite its slow growth, it was observed that its spores parasitize the sclerotia of *B. cinerea*. On the other hand, the isolate of *Alternaria* sp. was located in grade III, consequently it was not efficient to avoid the growth of the pathogenic fungus.

Keywords: Biocontrol, *Clonostachys*, endophyte, gray mold, antagonist.

INTRODUCCIÓN

En Ecuador, el cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth) se produce principalmente en las provincias de Tungurahua y Bolívar, y en menor escala en Imbabura, Cotopaxi, Chimborazo,

Pichincha y Carchi (Viteri *et al.*, 2016). El cultivar mora de Castilla (con y sin espinas) es el más cultivado en el país por su contenido de grados Brix (12°) y aceptación a nivel local tanto para consumo en fresco como para la agroindustria (Iza *et al.*, 2020). Este cultivo se propaga principalmente por semilla (Vásquez *et al.*, 2019) y abarca cerca de 5300 productores en una superficie de 5048 ha, con un rendimiento promedio de 6,8 t/ha⁻¹ (Alwang *et al.*, 2019).

El uso de agentes biológicos para fomentar una agricultura sustentable está siendo promovido en Ecuador (Viera y Jackson, 2020; Viera *et al.*, 2020a). En mora se ha desarrollado componentes tecnológicos para mejorar el manejo agronómico que permita incrementar su productividad, entre los cuales, el uso de Trichoderma como agente de biocontrol (Martínez *et al.*, 2019; Viera *et al.*, 2019a; Viera *et al.*, 2020b). Sin embargo, a pesar del gran potencial que tiene este cultivo en el Ecuador, los problemas fitosanitarios que afectan a este frutal limitan los rendimientos y por esa razón se han buscado alternativas biológicas que permitan el control de plagas (Acosta *et al.*, 2020), puesto que al momento los programas de mejoramiento se han centrado en caracteres morfológicos (plantas sin espinas) (Viera *et al.*, 2019b) y no existen variedades resistentes al ataque de plagas. Consecuentemente, el manejo integrado de plagas constituye una herramienta fundamental para lograr rendimientos altos y rentables en el cultivo.

Uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta a este cultivo, es la *enfermedad* denominada “moho gris” causada por el hongo *Botrytis cinerea*, que ocasiona importantes pérdidas económicas y afectando al 91,8% de los productores de este frutal (Villares *et al.*, 2016). El síntoma de la enfermedad se presenta en el fruto y el pedúnculo generalmente en estados ya avanzados, por lo cual se recomienda que el manejo de esta enfermedad sea preventivo con la posibilidad de reducir infecciones quiescentes que el hongo produce en las flores y que posteriormente se manifiestan en el fruto. Varios estudios han demostrado que el uso excesivo de fungicidas ha generado resistencia a algunas moléculas químicas como las del grupo de las dicarboximidas (Cosseboom *et al.*, 2020; Kleper, 2017), por lo que la investigación de nuevas alternativas al control químico se vuelve necesaria. En este sentido, Nobre *et al.* (2005), han encontrado que hongos del género *Clonostachys* reducen la esporulación de *B. cinerea* en rosas (*Rosa* sp.) de 81.0 hasta 97.4%, en fresa (*Fragaria x ananassa*) de 87.6 hasta 96.8% y en eucalipto (*Eucaliptus globulus*) de 63.7 hasta 89.7%.

Por otro lado, se ha reportado que la aplicación de *Trichoderma* disminuye la incidencia del moho gris (Martínez *et al.*, 2019) e incrementa el rendimiento del cultivo de mora hasta en un 20% (Viera *et al.*, 2019a; Viera *et al.*, 2020b).

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antagónica de dos hongos endófitos (*Clonostachys* sp. y *Alternaria* sp.) aislados de plantas de mora y dos aislados del género *Trichoderma* de la colección de INIAP, para determinar su potencial como controladores biológicos para el control de *B. cinerea*. Se evaluó los dos hongos endófitos aislados de los tallos de las plantas de mora porque se ha reportado que los hongos endófitos poseen actividad antagónica frente a la mayoría de los hongos que crecen en la superficie de las plantas, creando de este modo un microhabitat con condiciones desfavorables para el desarrollo de los hongos patógenos superficiales y previniendo su penetración en el interior de los tejidos (Bertoni, 1988).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de microorganismos

Para el aislamiento de *B. cinerea*, se recolectaron frutos de mora (*Rubus glaucus* Benth.) con signos de moho gris; mientras que para el aislamiento de los microorganismos endófitos, se tomaron tallos de 10 plantas sanas. Las muestras fueron colectadas en la plantación de la Granja Experimental Tumbaco (-0.214933, -78.412072) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ubicado en la parroquia de Tumbaco, cantón Quito, en Ecuador.

En la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, los frutos con presencia de moho gris se incubaron en cámaras húmedas a una temperatura de 20°C por una semana para favorecer la esporulación del hongo patógeno. *B. cinerea* se aisló a partir de la esporulación grisácea obtenida en los frutos colocados en las cámaras húmedas. Se tomaron muestras de esporas y se sembraron en placas Petri con agar PDA, las cuales se incubaron a 25 °C por un período de 7 días hasta que se observó la formación de colonias fúngicas, seleccionándose el aislado de crecimiento más rápido para realizar las pruebas de antagonismo.

En el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, los tallos de plantas sanas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% por 1 minuto, posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos con agua destilada estéril y

se procedió a cortar segmentos de tallo (2 a 3 mm) que fueron colocados en agar PDA en condiciones de esterilidad. Las cajas se incubaron a 25°C hasta que se observaron colonias fúngicas. Los hongos endófitos aislados fueron purificados mediante siembras sucesivas en medio de cultivo PDA y fueron identificados morfológicamente como *Clonostachys* sp. y *Alternaria* sp., para lo cual se utilizó claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1998; Toledo *et al.*, 2006).

Los aislados de *Trichoderma* pertenecen a la colección del Laboratorio de Control Biológico de INIAP de la Estación Experimental Santa Catalina. Éstas se sembraron en medio de cultivo PDA y se incubaron a 25 °C por un período de 7 días, para proceder a su recuperación.

Postulado de Koch para *Alternaria* sp.

Para la confirmación de que los hongos endófitos no eran patogénicos, se realizó los postulados de Koch. Se tomó tallos sin hojas de 18 cm de largo y de 12 mm de diámetro, los extremos de tallos fueron cubiertos con parafina para sellar y prevenir la deshidratación. Se realizó un corte en zona ecuatorial en cada tallo en la epidermis superficial con un bisturí estéril, sin dañar el tejido del cambium. Se tomaron discos de 5 mm de diámetro con micelio activo de los respectivos hongos y se colocó en la herida realizada en el tallo, sellando con parafilm.

Posteriormente se los colocó 3 tallos inoculados en cámaras húmedas (cajas plásticas con papel toalla húmeda, cubierta por un plástico transparente) tapadas herméticamente. Las cajas se colocaron en la incubadora a 26°C por 15 días. Para los controles se utilizó discos de agar sin inóculo.

Evaluación del potencial antagonista en pruebas *in vitro*

Cada hongo (endófitos y aislados de *Trichoderma*) se colocó en un extremo de la caja de Petri (a dos 2 cm del borde), utilizando un disco de 5 mm de diámetro de PDA con crecimiento fúngico activo, y al otro extremo de la caja se colocó un disco de 5 mm de PDA con micelio de *B. cinerea*. Los discos de 5 mm provinieron de cajas de cultivos monospóricos de una edad de 12 días para uniformizar este parámetro. Las cajas se incubaron a 25°C y se evaluó el crecimiento radial del hongo hasta los 12 días para las aislados del género *Trichoderma* y hasta los 14 días para el endófito *Alternaria* sp.; mientras que para *Clonostachys* sp., hasta el día 20 debido al lento crecimiento de este organismo. El crecimiento radial fue medido con un calibrador digital y se consideró el crecimiento del

micelio del hongo con potencial antagonista incluso hasta cuando se sobrepuso al micelio del patógeno, razón por la cual se obtuvieron medidas decrecientes para *B. cinerea* en los casos que se enfrentó a los aislados de *Trichoderma*. Además, se tuvieron controles de cada microorganismo, para lo cual se sembró independientemente un disco de 5 mm de PDA con crecimiento fúngico activo en un extremo de la caja de Petri.

Para evaluar el antagonismo se utilizó la escala de Bell *et al.* (1982), la cual consta de cinco niveles: I) el antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno; II) el antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo; III) el antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro; IV) el patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja Petri y; V) el patógeno llega a cubrir totalmente la caja Petri.

En el caso del efecto antagónico, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) a los 7 y 12 días, utilizando la fórmula descrita por Skidmore y Dickinson (1976):

$$\text{PIC} = [(C1-C2)/C1] \times 100.$$

Dónde: C1 es el crecimiento radial del testigo (fitopatógeno sin antagonista) y C2 el crecimiento radial del fitopatógeno en los tratamientos en cultivo dual. Esta prueba se realizó para todos los microorganismos con potencial antagónico, a los 7 y 12 días posteriores a la inoculación como indica el protocolo propuesto por Skidmore y Dickinson (1976).

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en una caja Petri. Los resultados de PIC y crecimiento radial se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias de Tukey al 95% de probabilidad para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Previo al ANOVA, los datos fueron explorados visualmente mediante histogramas y test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Massey, 1951). Debido a que los datos del PIC no presentaron una distribución normal, fueron sometidos a una transformación Log10 para su normalización. Todos los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico *R Estudio* versión 1.0.143.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Postulados de Koch para el endófito *Alternaria* sp.

Transcurridos los 15 días de la inoculación de *Alternaria* sp., se procedió a revisar los tallos en las cámaras húmedas, observándose que no existió sintomatología (necrosamiento) de infección (Figura 1). Además para confirmar se realizó un corte transversal a la zona de inoculación, observándose que no hubo daño en el tejido interno.



Figura 1. Inoculación de tallos de mora con el endófito *Alternaria* sp. Tallo inoculado con discos de agar con micelio activo en la zona ecuatorial (izquierda) y tallos sin sintomatología después de 15 días de la inoculación (derecha).

Crecimiento radial

Los aislados de *Trichoderma* sp. y *T. asperellum* presentaron el mayor crecimiento radial (67.8 mm) en la prueba dual a los 12 días, valor que fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) al crecimiento alcanzado por *B. cinerea* (Tabla 1, Figura 2). El crecimiento alcanzado por los aislados de *Trichoderma* en la prueba dual fue igual al crecimiento que presentaron estos hongos en los tratamientos control. Sin embargo, cabe destacar que la aislado de *T. asperellum* logró alcanzar este valor máximo de crecimiento a los 7 días, razón por la cual tendría mayor efectividad.

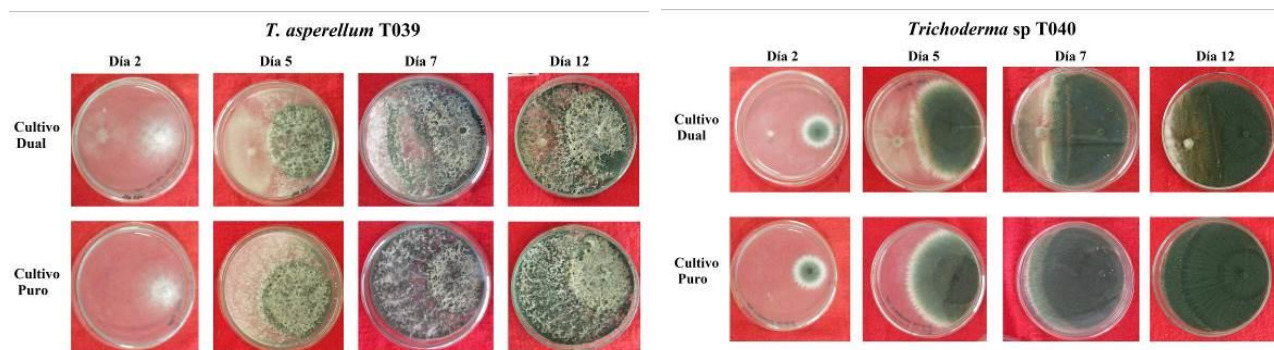
El organismo endófito *Clonostachys* sp., mostró un crecimiento más rápido que *B. cinerea* en la prueba dual a los 20 días (Tabla 1, Figura 2), estos valores fueron diferentes estadísticamente ($P < 0.05$). El crecimiento alcanzado por *Clonostachys* sp. en la prueba dual fue el 84% del alcanzado por este hongo en el tratamiento control, lo que indicaría que existió un efecto sobre *B. cinerea* puesto que éste solo se desarrolló un 35% en el cultivo dual en

comparación con el crecimiento observado en su control.

El organismo endófito *Alternaria* sp. presentó un crecimiento estadísticamente diferente ($P < 0.05$) al de *B. cinerea* a los 14 días; sin embargo el mayor crecimiento se observó en el organismo patógeno (Tabla 1, Figura 2). *Alternaria* sp. alcanzó un crecimiento correspondiente al 45% del crecimiento obtenido en el tratamiento control de este hongo, lo que indicaría que *B. cinerea* tuvo mayor eficiencia en su crecimiento y el hongo endófito no sería adecuado para evitar el desarrollo del patógeno.

Tabla 1. Crecimiento radial promedio (mm) de los microorganismos con potencial antagonista (n=440).

Microorganismo	Días					
	2	5	7	12	14	20
<i>B. cinerea</i>	19.8a	19.6a	-	-	-	-
<i>T. asperellum</i>	28.0b	36.6b	67.8	67.8	-	-
<i>B. cinerea</i> Testigo	20.4a	50.0c	67.8	67.8	-	-
<i>T. asperellum</i> Testigo	27.8b	67.8d	67.8	67.8	-	-
<i>B. cinerea</i> .	19.8	19.8a	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	19.8	41.2b	55.4a	67.8	-	-
<i>B. cinerea</i> . Testigo	20.4	50.0c	67.8b	67.8	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. Testigo	20.0	50.2c	66.6b	67.8	-	-
<i>B. cinérea</i>	21.2ab	28.6b	34.2b	31.6a	29.0a	24.0a
<i>Clonostachys</i> sp.	21.6ab	23.4a	30.0a	31.5a	39.0b	44.4b
<i>B. cinerea</i> Testigo	22.0b	43.4c	67.8c	67.8c	67.8d	67.8d
<i>Clonostachys</i> sp. Testigo	20.8a	23.2a	33.6b	35.6b	40.2c	53.0c
<i>B. cinérea</i>	22.2a	26.6b	38.8b	38.8b	38.8b	-
<i>Alternaria</i> sp.	23.2b	24.2a	25.6a	25.6a	25.6a	-
<i>B. cinerea</i> . Testigo	33.4d	33.4c	67.8d	67.8d	67.8d	-
<i>Alternaria</i> sp. Testigo	26.0c	26.2b	40.6c	48.8c	56.4c	-



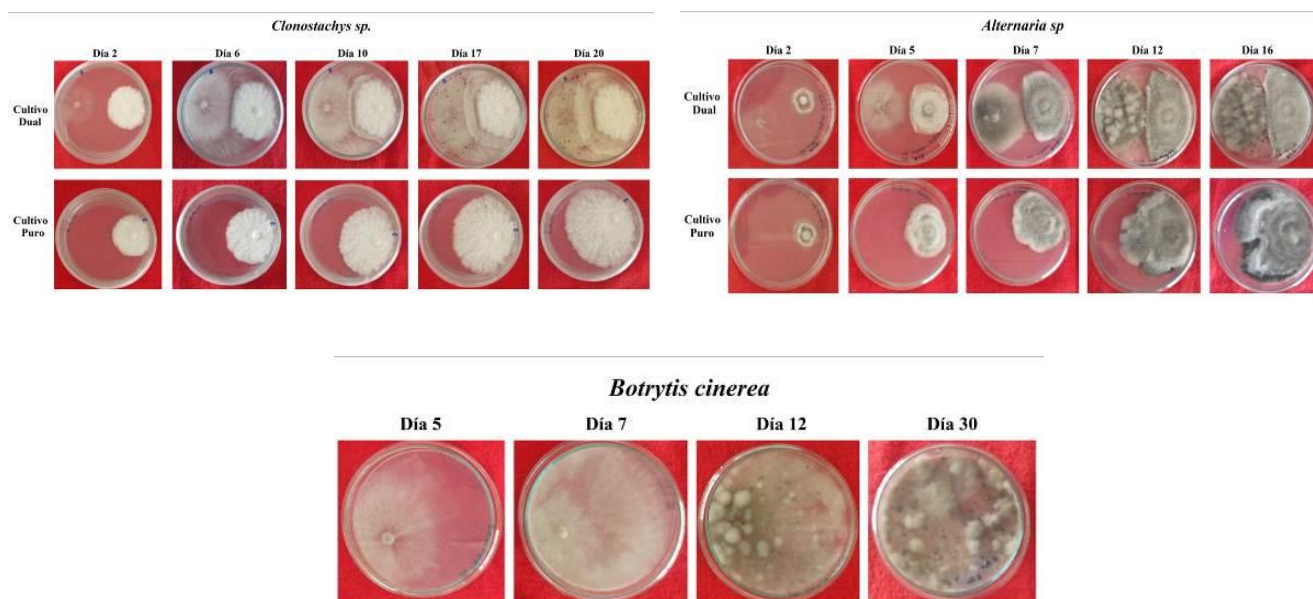


Figura 2. Crecimiento radial de las dos aislados de *Trichoderma* y los dos aislamientos de hongos endófitos evaluados mediante la técnica de cultivo dual, y el control del patógeno *B. cinerea*.

Inhibición del crecimiento radial

Las aislados de *T. asperellum* y *Trichoderma* sp., presentaron los valores más altos de inhibición del crecimiento radial de *B. cinerea* con un PIC de 75.6 y 75.1%, respectivamente; valores que fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) con respecto a la inhibición de los hongos endófitos *Alternaria* sp. y *Clonostachys* sp. con 55.2 y 54.6% a los 12 días de la evaluación (Tabla 2). No obstante, el porcentaje de inhibición de *Clonostachys* sp. aumentó con el tiempo llegando a alcanzar el 65,5% a los 20 días de evaluación.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *B. cinerea* evaluados en cultivo dual con hongos con potencial antagonista a los 7 y 12 días (n=160).

Microorganismo	7 días	12 días
<i>T. asperellum</i>	73.7 $\pm$ 3.8 a	75.1 $\pm$ 2.1 a
<i>Trichoderma</i> sp.	75.1 $\pm$ 2.0 a	75.6 $\pm$ 1.9 a
<i>Alternaria</i> sp.	51.1 $\pm$ 3.6 b	55.2 $\pm$ 2.8 b
<i>Clonostachys</i> sp.	50.9 $\pm$ 3.4 b	54.6 $\pm$ 3.1 b

Medias dentro de columnas con letras distintas difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey al

5% de probabilidades de error.

Diferentes especies pertenecientes al género *Trichoderma* han sido reportadas efectivas como controladores biológicos de *B. cinerea* suprimiendo la esporulación de este hongo patógeno (You *et al.*, 2016; Pertot *et al.*, 2017). Schirmböck *et al.* (1994), encontraron que el género *Trichoderma* produce sustancias antibióticas como peptaibol, trichozianinas A1 y B1, que son responsables del efecto de inhibición de la germinación de esporas y elongación de hifas de otros hongos como *B. cinerea*. Los resultados de este estudio mostraron la misma tendencia que los obtenidos por Calvo *et al.* (2012) y Marín *et al.* (2017), quienes obtuvieron resultados de PIC superiores al 70% al enfrentar a *Trichoderma* con *Botrytis*.

El endófito aislado a partir de mora e identificado como *Clonostachys* sp. no fue tan agresivo como los aislados de *Trichoderma*; sin embargo, logró parasitar los esclerocios de *B. cinerea*. Según Ribera (2007), *B. cinerea* presenta enzimas antioxidantes, que pueden incidir en el ataque por el antagonista del género *Clonostachys*. En el día 20, en las cajas Petri se pudo observar que el 23,3% de los esclerocios de *Botrytis* fueron cubiertos por las esporas de *Clonostachys* sp. (Figura 3). Además, la evaluación de cultivos duales mostró una zona de interacción del micelio de *Clonostachys* sp. y *B. cinerea*, donde se pudo observar que las hifas del hongo endofítico se envolvieron en las hifas del hongo patógeno (Figura 3). Se ha reportado que *C. roseae* tiene un efecto antagónico sobre *B. cinerea* en distintas especies de frutales, demostrando diferentes mecanismos de acción como micoparasitismo, antibiosis y competencia por sustrato o nutrientes, además de inducir resistencia (Nobre *et al.*, 2005; Mamarabadi *et al.*, 2008; Rodríguez y Chico, 2013; Gong *et al.*, 2017). Además, algunas especies de *Clonostachys* han demostrado compatibilidad con agroquímicos por lo que este género representa un potencial controlador biológico para ser aplicado en campo (Cota *et al.*, 2008).

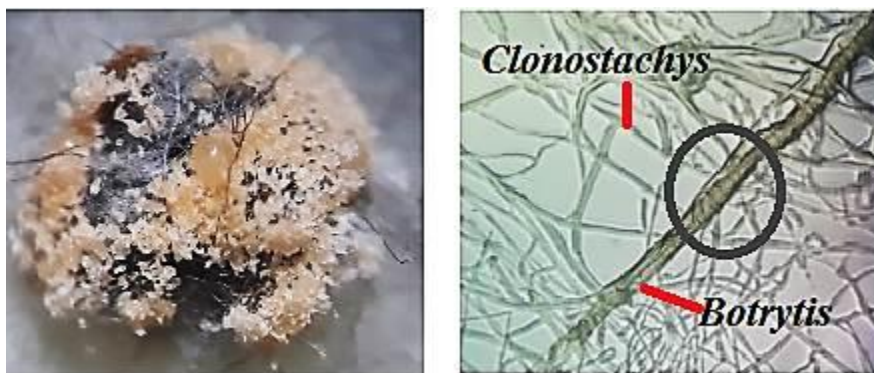


Figura 3. Crecimiento de *Clonostachys* sp. sobre *B. cinerea*. Izquierda) esclerocio observado en esteroscopio (100X), Derecha) Interacción entre el micelio de los dos hongos observada en microscopio óptico (400X).

Grado de antagonismo

Los distintos hongos evaluados presentaron diferente respuesta en relación a su efecto antagónico contra *B. cinerea* (Tabla 3), resultados basados en la escala de clases de Bell *et al.* (1982).

Tabla 3. Categorías de competencia en base a la escala de Bell de cada microorganismo evaluado.

Microorganismo	Clase
<i>T. asperellum</i> (T040)	I
<i>Trichoderma</i> sp. (T039)	I
<i>Alternaria</i> sp.	III
<i>Clonostachys</i> sp.	II

Los aislados de *Trichoderma* se ubicaron en la categoría I de la escala de Bell, resultados similares a los obtenidos por Calvo, *et al.* (2012), en el que se evaluaron seis aislados de *Trichoderma* por la técnica de cultivos duales con *B. cinerea*, dos alcanzaron la categoría I y 4 encajaron en la categoría II. Por su parte, *Clonostachys* se ubicó en la categoría II, resultados similares a los obtenidos en el estudio de Vásquez, (2013) y Flores *et al.* (2015). El aislado de *Clonostachys* sp. a pesar de su lento crecimiento mostró tener un crecimiento sobre los esclerocios de *B. cinerea* (Figura 3); sin embargo, se deben realizar ensayos en campo para determinar como el ambiente influye en el desarrollo de este hongo previo a considerarlo para su uso en el desarrollo de un biocontrolador.

Por otro lado, *Alternaria* sp. se encajó en la categoría III, lo que se calificaría como una eficiencia media para el control del patógeno debido a que Bell *et al.* (1982) consideran que un aislado de un hongo es antagonista del patógeno si la puntuación media para una comparación dada es menor a 2 pero no superior a 3. Sin embargo, un buen antagonista debe presentar un crecimiento rápido, presentar gran cantidad de conidios, crecer en condiciones diferentes de carbono y nitrógeno y tolerar condiciones adversas; por estas razones se consideró que *Alternaria* sp. no se comportó como un hongo antagonista puesto que su velocidad de crecimiento fue menor a la del patógeno y cada microorganismo creció hasta

encontrarse con el otro.

Las aislados de *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. mostraron una velocidad de crecimiento mayor a la de *B. cinerea* e invadieron el espacio ocupado por el patógeno. Infante *et al.* (2009) menciona que las especies del género *Trichoderma* son las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos ya que presentan diferentes mecanismos de acción entre los que se encuentran: competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros.

CONCLUSIONES

Las aislados de *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. fueron de rápido crecimiento y esporulación, inhibiendo el crecimiento de *B. cinerea*. Además, crecieron sobre el micelio de *Botrytis* implicando un mecanismo de acción de parasitismo. Por otro lado, *Clonostachys* sp. mostró una interacción con el micelio y los esclerocios de *B. cinerea*; sin embargo, su lento crecimiento no lo califica como un buen antagonista. Finalmente, el aislado del hongo endófito *Alternaria* sp. no mostró un efecto antagonista puesto que al confrontarse con *B. cinerea*, ambos microorganismos crecieron respetando el espacio del otro.

Se recomienda realizar pruebas en campo con los hongos que demostraron un potencial antagonista, así como realizar su identificación a nivel de especie mediante técnicas moleculares.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto “Biocontrol Systems for Sustainable Agriculture, Ecuador” financiado por MFAT-New Zealand y a AgResearch por el apoyo técnico. Actividades enmarcadas en el contrato MAE-DNB-CM-2015-0024-M-001.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Acosta Ruales, M. J., Viera, W. F., Jackson, T., & Vásquez Castillo, W. (2020). Technological alternatives for the control of *Botrytis* sp. In Andean blackberry (*Rubus glaucus*). Enfoque UTE, 11(2), 11-20. <https://doi.org/10.29019/enfoque.v11n2.521>
- Alwang, J., Barrera, V.H., Andrango, G., Domínguez, J.M., Martínez, A., Escudero, L., & Montúfar, C. (2019). Value-chains in the Andes: upgrading for Ecuador's blackberry

- producers. Journal of Agricultural Economics, 70(3), 705–730. <https://doi.org/10.1111/1477-9552.12329>.
- Barnett, H. L., & Hunter B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. Minnesota: APS Press.
- Bell, D. K., Wells, H. D., & Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, 72(4), 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Bertoni, M. (1988). Interactions between epiphytes and endophytes from the phyllosphere of *Eucalyptus uiminalis*. Nova Bedwigina, 47, 219.
- Calvo, J. A., Rivera, G., Orozco, S., & Rodríguez, R. O. (2012). Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. Agronomía mesoamericana, 23(2), 225-231.
- Cota, L. V., Maffia, L.A., Mizubuti, E. S. G., Macedo P. E. F., & Antunes, R.F. (2008). Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. Biological Control, 46, 515-522. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.023>
- Cosseboom, S., Schnabel, G., & Hu, M. (2020). Competitive ability of multi-fungicide resistant *Botrytis cinerea* in a blackberry planting over three years. Pesticide Biochemistry and Physiology, 163, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.008>
- Flores, W., Chico, J., & Cerna, L. (2015). Actividad antagónica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. 35(1), 34-42.
- Gong, C., Liu, Y., Liu, S., Cheng, M., Zhang, Y., Wang, R., Chen, H., Li, J., Chen, X., & Wang, A. (2017). Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to grey mould disease and identification of the key proteins induced in tomato fruit. Postharvest Biology and Technology, 123, 83-93. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.08.004>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Protección Vegetal 24(1): 14-21.
- Iza, M., Viteri, P., Hinojosa, M., Martínez, A., Sotomayor Correa, A., & Viera, W. (2020). Morphological, phenological and pomological differentiation of commercial cultivars

- of blackberry (*Rubus glaucus* Benth). Enfoque UTE, 11(2), pp. 47-57.
<https://doi.org/10.29019/enfoque.v11n2.529>
- Kleper, A. (2017). Control de *Botrytis cinerea* Pers. en fresa (*Fragaria x ananassa* duch.) Cv. Aromas mediante fungicidas biológicos y - químicos en Huaral. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Mamarabadi M., Jensen, B., Jensen, D., & Lubeck, M. (2008). Real-time RT-PCR expression analysis of chitinase and endoglucanase genes in the three-way interaction between the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726, *Botrytis cinerea* and strawberry. FEMS Microbiology Letters, 285(1): 101-110. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01228.x>
- Marín, M., Ribera, G., Villalobos, K., Orozco, R., & Orozco S. (2017). Evaluación de hongos antagonistas de *Botrytis cinerea* Pers. en plantaciones de mora, Costa Rica. Agronomía Costarricense. 41(1), 7-18. <https://doi.org/10.15517/rac.v41i1.29737>
- Martínez, A., Villacís, L., Viera, W., Jácome, R., Espín, M., León, O., & Santana, R. (2019). Evaluación de nuevas tecnologías de producción limpia de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), en la zona Andina de Ecuador, para un buen vivir de los fruticultores. Journal of the Selva Andina Biosphere, 7(1), 63-70.
- Massey, F. J. (1951). The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. Journal of the American Statistical Association, 46(253), 68-78.
<https://doi.org/10.1080/01621459.1951.10500769>
- Nobre, S. A., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S., Cota, L. V., & Dias, A. P. S. (2005). Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. Biological Control, 34(2), 132-143.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.04.011>
- Pertot, I., Geovannini, O., Benanchi, M., Caffi, T., Rossi, V., & Mugnai, L. (2017). Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. Crop Protection, 97(1), 85-93.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.010>
- Ribera, A. (2007), Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja saponaria* Mol. cultivada in vitro en *Botrytis cinerea* Pers. Temuco: Universidad de la Frontera.

- Rodríguez, M. R., & Chico, J. R. (2013). Efecto antagónico in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Vitis vinífera*. *Rebiol*, 33(2), 42-49.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y., Hayers, C., Arisan, I., Scala, F., Harman, G., & Kubicek, C. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4364-4370.
- Skidmore, A. M., & Dickinson, C. H. (1976). Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(1), 57-64. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80092-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80092-7)
- Toledo, A. V., Virla, E., Humber, R. A., Paradell, S. L., & López C. C. (2006). First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(1), 7-10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.10.005>
- Vásquez, M. (2013). Acción antagónica in vitro de *Clonostachys rosea* f. sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* pers. Y *Fusarium oxysporum* f. procedente de *Asparagus officinalis* L. *SAGASTEGUIANA*, 1(1), 19-28.
- Vásquez, W., Pupiales, P., Viteri, P., Sotomayor, A., Feicán, C., Campaña, D., & Viera, W. (2019). Chemical scarification and use of gibberellic acid for seed germination of blackberry cultivars (*Rubus glaucus* Benth). *Interciencia*, 44(3), 161-166.
- Villares, M., Martínez, A., Viteri, P., Viera, W., Jácome, R., Ayala, G., & Noboa, M. (2016). Manejo de plagas identificadas en el cultivo de la mora de Castilla. In: *El cultivo de la mora en el Ecuador*. Galarza, D.; Garcés, S.; Velásquez, J.; Sánchez, V.; Zambrano J. (eds.). Quito: INIAP.
- Viera, W., Noboa, M., Martínez, A., Báez, F., Jácome, R., Medina, L., & Jackson, T. (2019a). *Trichoderma asperellum* increases crop yield and fruit weight of blackberry (*Rubus glaucus*) under subtropical Andean conditions. *Vegetos*, 32(2), 209-215. <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00024-5>
- Viera, W., Sotomayor, A., & Viteri, P. (2019b). Breeding of three Andean fruit crops in Ecuador. *Chronica Horticulturae*, 59(4), 20-29.

- Viera, W., & Jackson, T. (2020). Ecuador demonstrates a sustainable way forward for small farmer producers. *Chronica horticulturae*, 60(3), 19-22.
- Viera, W., Tello, C., Martínez, A., Navia, D., Medina, L., Delgado, A., Perdomo, C., Pincay, A., Báez, F., Vásquez, W., & Jackson, T. (2020a). Biological control: A tool for sustainable agriculture, a point of view of its benefits in Ecuador. *Journal of Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149. <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200128x>
- Viera, W., Noboa, M., Martínez, A., Jácome, R., Medina, L., & Jackson, T. (2020b). *Trichoderma* application increases yield and individual fruit weight of blackberries grown by small farmers in Ecuador. *Acta Horticulturae*, 1277, 287-291. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1277.42>
- Viteri, P., Vásquez, W., Viera, W., Sotomayor, A., & Mejía, P. (2016). Ecología para el desarrollo y crecimiento de la mora. In: *El cultivo de la mora en el Ecuador*. Galarza, D.; Garcés, S.; Velásquez, J.; Sánchez, V.; Zambrano J. (eds.). Quito: INIAP.
- You L., Zangh L., Wu M., Yang L., Chen W., & Li G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*, 101, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.006>