



Hongos endófitos asociados a *Vitis vinifera* con capacidad de antibiosis hacia *Botrytis cinerea**

Endophytic fungi associated to *Vitis vinifera* with antibiosis capacity against *Botrytis cinerea*

Betsabé León-Ttacca¹, Juan Alca-Zavala¹, Jefferson Rosas-Martínez¹, Eddy Robles-Perez¹, Paola Zamudio-Eustaquio¹, Luis García-Díaz¹

* Recepción: 21 de agosto, 2023. Aceptación: 6 de noviembre, 2023. Este trabajo formó parte de los resultados del proyecto de investigación “Colecta de hongos endófitos con potencial de biocontrol del agente causal del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la vid (*Vitis vinifera*) en Cañete” realizado por el semillero de investigación “Agrobiodiversidad Cañetana” en el laboratorio de Sanidad Vegetal, Escuela Profesional de Agronomía, Universidad Nacional de Cañete (UNDC). Lima, Perú.

² Universidad Nacional de Cañete, Escuela Profesional de Agronomía. Lima, Perú. bleon@undc.edu.pe (autora para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0002-4343-2431>), juan.zavala2897@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0001-7617-7054>), jefersonrosas340@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0001-9173-9078>), eddyroblesperez@gmail.com (<https://orcid.org/0009-0006-4332-1914>), briggitta5@gmail.com (<https://orcid.org/0009-0003-0509-6662>), 1972711355@undc.edu.pe (<https://orcid.org/0009-0002-9877-4794>).

Resumen

Introducción. Los hongos endófitos (HE) de la vid (*Vitis vinifera*) tienen un gran potencial de aplicación en la agricultura y pueden representar posibles agentes de control biológico de los viñedos. **Objetivo.** Aislar e identificar los hongos endófitos (HE) de plantas de vid con capacidad de antibiosis hacia *Botrytis cinerea*. **Materiales y métodos.** Se colectaron ramas jóvenes y maduras de cuarenta plantas sanas de vid de siete lotes de producción en la provincia de Cañete, Lima, Perú, durante los meses de marzo a mayo 2022. El aislamiento de HE se realizó de 702 secciones de tejidos desinfectados en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y la identificación fue a nivel de género. Se extrajeron metabolitos secundarios de veintiocho cepas de HE para determinar la inhibición micelial del patógeno. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANDEVA) de los parámetros evaluados con el programa estadístico Minitab. **Resultados.** Se aislaron un total de 129 cepas de HE de hojas y tallos de ramas jóvenes y maduras de vid que corresponden a siete géneros (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Nigrospora* y *Stemphylium*). La mayor frecuencia se presentó en las hojas y rama madura; y *Trichoderma* y *Alternaria* fueron los géneros más frecuentes en las plantas de vid con 22,48 % y 21,71 %, respectivamente. Los metabolitos obtenidos de las cepas HEVH -01 del género *Cladosporium*, y HEV - 99 y HEV - 70 del género *Alternaria* tuvieron mayor efecto en la inhibición micelial del patógeno. **Conclusiones.** Cepas de hongos endófitos del género *Cladosporium* y *Alternaria* mostraron capacidad de antibiosis hacia *Botrytis cinerea* a escala de laboratorio que podrían ser potenciales biocontroles como una alternativa al control químico de las enfermedades vid.

Palabras claves: antagonismo, metabolitos, moho, biocontrol.



Abstract

Introduction. Endophytic fungi (EF) in grapevines (*Vitis vinifera*) hold significant potential for agricultural applications and could serve as potential biological control agents for vineyards. **Objective.** To isolate and identify endophytic fungi (EF) from grapevine plants capable of displaying antibiosis towards *Botrytis cinerea*. **Materials and methods.** Young and mature branches were collected from forty healthy grapevine plants across seven production lots in the Cañete province, Lima, Peru, between March and May 2022. EF isolation was carried out from 702 disinfected tissue sections on potato dextrose agar (PDA) medium, with genus-level identification. Secondary metabolites were extracted from twenty-eight EF strains to determine their inhibition of the pathogen's mycelium growth. Analysis of Variance (ANOVA) was conducted using the Minitab statistical software for evaluated parameters. **Results.** A total of 129 EF strains were isolated from leaves and stems of young and mature grapevine branches, encompassing seven genera (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Nigrospora*, and *Stemphylium*). The highest frequency occurred in leaves and mature branches; *Trichoderma* and *Alternaria* were the most prevalent genera, constituting 22.48% and 21.71% of total isolates, respectively. Metabolites derived from the EFVH-01 strain of the *Cladosporium* genus, as well as EF-99 and EF-70 strains of the *Alternaria* genus, displayed the greatest impact on inhibiting the pathogen's mycelium growth. **Conclusions.** Strains of endophytic fungi of the genus *Cladosporium* and *Alternaria* showed antibiosis capacity towards *Botrytis cinerea* at the laboratory scale and could potentially serve as biocontrols, offering an alternative to chemical disease management in grapevines.

Keywords: antagonism, metabolites, mold, biocontrol.

Introducción

La vid es uno de los cultivos agrícolas más demandados e importantes del mundo, y Perú se constituye en el proveedor exportador más dinámico y competitivo. Sin embargo, la calidad y el rendimiento en las uvas de mesa y vino se ve afectada por el moho gris (*Botrytis cinerea* Pers.), una de las enfermedades fúngicas más prevalentes durante la maduración y el manejo poscosecha (Li et al., 2020). El enfoque principal para el manejo de esta enfermedad es el control químico, lo que conlleva al desarrollo de resistencia del patógeno a fungicidas (De Miccolis Angelini et al., 2014). Por lo tanto, para el control de esta enfermedad, es necesario desarrollar enfoques alternativos a los fungicidas químicos con el uso de agentes de control biológico.

En este cultivo, diferentes agentes de biocontrol funcionan contra diversos patógenos. Entre los antagonistas, se tiene a los hongos endófitos de la uva con capacidad para reducir la colonización de microorganismos patógenos que causan enfermedades de la uva (Aleynova et al., 2022). La resistencia inducida, la antibiosis y el parasitismo directo son mecanismos de acción que pueden suprimir la actividad de los patógenos en las plantas hortícolas (Sánchez-Fernández et al., 2013). Sin embargo, se sabe poco acerca de los hongos endófitos que actúan contra *B. cinerea* en la vid.

El estudio de comunidades endófitas de uvas en el valle Cañete es de gran interés debido que *Vitis vinifera* L. es considerado un sistema modelo de planta para estudiar la microbioma de cultivos leñosos perennes (Deyett & Rolshausen, 2020). Los endófitos son organismos que viven dentro de los tejidos de las plantas y, a menudo, forman asociaciones mutualistas que brindan efectos beneficiosos a sus huéspedes, sin causar ningún síntoma de enfermedad, por el contrario, fortalecen la defensa contra los factores bióticos (Fan et al., 2020). El establecimiento de una relación fúngica endofítica depende del genotipo del huésped y juegan un papel importante en la adaptación al hábitat de las plantas, lo que resulta en un mejor rendimiento de las plantas y en la protección contra el estrés biótico y abiótico (Lugtenberg et al., 2016)

Los hongos endófitos están siendo investigados en muchos cultivos, debido a su importancia en los patosistemas vegetales naturales, que son fundamentales para la biodiversidad y la conservación (Busby et al., 2016). Varios autores han investigado la diversidad y el papel ecológico de las comunidades endófitas en la vid (Aleynova et al., 2022; Cosoveanu et al., 2014; Deyett & Rolshausen, 2020; Fan et al., 2020; Kernaghan et al., 2017; Pancher et al., 2012; Stranska et al., 2022; Reis Varanda et al., 2016). Sin embargo, el conocimiento de la influencia de hongos endófitos en el desarrollo y/o prevención de ciertas enfermedades fúngicas es aún incompleto. Por lo tanto, el presente estudio se centra en aislar e identificar hongos endófitos asociados a plantas de vid (*V. vinifera*) con capacidad de antibiosis hacia *B. cinerea*.

Materiales y métodos

Muestreo y aislamiento de hongos endófitos

Se visitaron ocho lotes de producción de vid (*Vitis vinifera*) var. Italia en la provincia de Cañete, Lima, Perú, durante los meses de marzo, abril y mayo del 2022. De cada lote de producción se seleccionaron cinco plantas sanas de vid (de cuatro años de edad) con las mejores características vegetativas, para un total de cuarenta plantas. Por cada planta se extrajeron sarmientos (ramas con hojas) con tejido vegetal maduro (sarmientos leñosos) y joven (sarmientos de campaña), las muestras fueron rotuladas, depositadas en bolsas de polipropileno y llevadas al laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional de Cañete (UNDC) para su procesamiento.

De cada rama (sarmiento), se tomaron tres hojas y tres trozos de tallos del tercio superior, medio e inferior; se cortaron pequeños trozos de hojas (1 cm²), secciones de tallos (1–1,5 cm de largo) o porciones (1 × 0,5 × 0,5 cm³) de las partes internas de los troncos, con seis trocitos por rama, 12 por planta y 60 por lote de producción. El aislamiento de hongos endófitos se realizó dentro de una cabina de bioseguridad, las secciones de tallos y hojas se desinfectaron en su superficie con hipoclorito de sodio al 2 % por 3 min para eliminar los hongos epífitos, seguido de 1 min en etanol 70 % (v/v) y tres lavados con agua destilada estéril (ADE) (Abdelaziz et al., 2022; De Sousa Leite et al., 2013).

Las secciones de tejidos desinfectados fueron colocadas para su secado sobre papel toalla esterilizada. Luego el material se cortó en fragmentos pequeños (0,5 cm²), y se transfirieron un total de 702 secciones de tejidos a placas Petri con el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) con cloranfenicol (0,2 g/L) (Abdelaziz et al., 2022; Shankar Mane et al., 2018). Las placas Petri sembradas fueron incubadas en oscuridad a 25 °C durante siete días, transcurrido este tiempo, se procedió a purificar las cepas hasta obtener un cultivo axénico.

Aislamiento e identificación de *Botrytis cinerea*

Se colectaron frutos de vid var. Italia con presencia de síntomas y signos del moho gris. Estos fueron llevados al laboratorio de sanidad vegetal de la UNDC. Con un bisturí estéril se extrajo fragmentos de micelios con esporas de los frutos, estos se transfirieron en placas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) suplementado con antibiótico y se incubó a 25 °C durante siete días. Luego se realizaron tinciones con lactofenol azul de las estructuras vegetativas, de reproducción asexual y conservación. Bajo un microscopio se visualizó las estructuras para la identificación con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998), Barrón (1968) y Watanabe (2002).

Identificación morfológica de hongos endófitos

Los cultivos axénicos de los hongos en PDA se colocaron bajo luz artificial durante siete días para inducir la producción de estructuras reproductivas asexuales para su identificación. Se observaron cada día las estructuras, y las cepas que no lograron formar estructuras reproductivas se dejaron bajo luz hasta los 30 días. La identificación se realizó a nivel de género, en base a sus características morfológicas.

Se observaron las características culturales de la colonia tales como aspecto, diámetro, textura y coloración. Se realizaron tinciones con lactofenol azul de los cultivos, y se observaron las características microscópicas: tipo y tamaño de las estructuras vegetativas y de reproducción. Las estructuras se visualizaron con un microscopio óptico binocular y con el uso de claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998), Barron (1968) y Watanabe (2002), se identificaron a nivel de género.

Prueba de antibiosis

La prueba de antibiosis se realizó con un diseño completamente al azar (DCA). Se extrajeron metabolitos secundarios solubles inhibitorios de veintiocho cepas de hongos endófitos según la metodología empleada por Leon-Tacca et al. (2022). De los cultivos jóvenes de HE (siete días de edad) se obtuvo una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. En matraces con 100 mL de medio líquido de caldo papa dextrosa (CPD) se depositó 1 mL de la suspensión de esporas y se incubaron en un agitador a 110 rpm por siete días a 25 °C (tres repeticiones por cada cepa).

Transcurrido el tiempo de incubación el micelio desarrollado en los matraces fue removido por filtración, se extrajo el filtrado en tubos falcón esterilizados y se centrifugaron a 3000 rpm por cinco minutos. El sobrenadante (15 mL del filtrado) se colocó en baño maría a 90 °C por una hora, luego se agregó un volumen igual de medio de cultivo PDA con 2x de agar al sobrenadante y se realizó la mezcla a una proporción 1:1 (v:v); y se transfirieron 10 mL de la mezcla en cajas Petri de 60 x 15 mm. Para los controles (testigo) se realizó la mezcla con el filtrado del CPD. Un disco de 5 mm de medio PDA con micelio del patógeno se colocó en el centro de las placas con los filtrados, se realizó tres repeticiones por filtrado, estas fueron incubadas a una temperatura de 25 °C por tres días.

La evaluación se realizó cuando el patógeno colonizó completamente las placas de los testigos a los tres días; con ayuda de un vernier digital, se registró las medidas del crecimiento radial de la colonia (mm) del patógeno en cuatro radios de las placas. El porcentaje de inhibición micelial se calculó mediante la ecuación 1 (Kouipou Toghueo et al., 2016).

$$I (\%) = \frac{C - T}{C} \times 100 \quad (1)$$

Donde %I es el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (radial), C la medida del crecimiento radial del patógeno en el control y T la medida de crecimiento radial del patógeno en presencia del biocontrolador.

Análisis de datos

Para analizar la relación entre las variables presencia o ausencia de cada uno de los géneros de hongos endófitos detectados por órganos (hojas y tallos) y ramas, se empleó la prueba no paramétrica Chi-cuadrado Pearson. Para la variable porcentaje de inhibición micelial, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y la comparación de medias mediante la prueba de Scott-Knott (95 %) con el programa estadístico Infostat **versión** (Di Rienzo et al., 2008).

cuál versión?

Resultados

Aislamiento e identificación de hongos endófitos asociados a plantas de vid

Del total de secciones procesadas de tallos y hojas de plantas de vid, en 129 (26,65 %) secciones crecieron hongos endófitos, de estas 96 se identificaron con base a sus características morfológicas, mientras que 33 cepas no formaron estructuras de reproducción, por lo que no fueron identificadas y se les denominó micelio estéril. Se identificaron los géneros de *Cladosporium* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Stemphylium* sp. y *Alternaria* sp. (Figura 1). La mayoría de las cepas identificadas presentaron estructuras de reproducción en menos de 6 a 7 días de incubación. Las placas PDA produjeron un promedio de una colonia por sección de tejido de la planta.

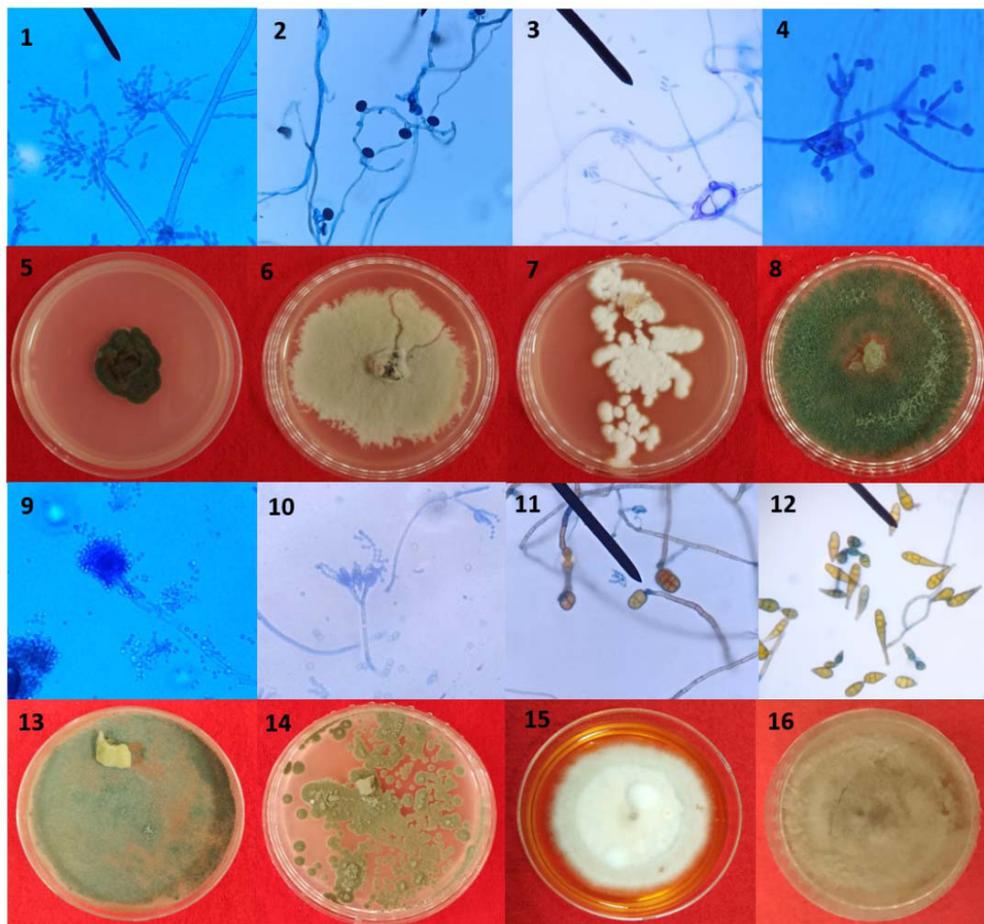


Figura 1. Géneros de hongos endófitos identificados en *Vitis vinifera* L. 1, 5. *Cladosporium* sp. 2, 6 *Nigrospora* sp. 3, 7 *Fusarium* sp. 4, 8 *Trichoderma* sp. 9, 13. *Aspergillus* sp. 10, 14 *Penicillium* sp. 11, 15. *Stemphylium* sp. 12, 16 *Alternaria* sp. a 100 X. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú, 2022.

Figure 1. Genera of endophytic fungi identified in *Vitis vinifera* L. 1, 5. *Cladosporium* sp. 2, 6 *Nigrospora* sp. 3, 7 *Fusarium* sp. 4, 8 *Trichoderma* sp. 9, 13. *Aspergillus* sp. 10, 14 *Penicillium* sp. 11, 15. *Stemphylium* sp. 12, 16 *Alternaria* sp. a 100 X. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú, 2022.

Frecuencias de géneros de hongos endófitos asociados a plantas de vid

Del total de las cepas aisladas de plantas de vid, el 74,42 % fueron hongos asexuales que se identificaron dentro de la clase de los Ascomycetos. Además, cuando se analizó el número de cepas aisladas de cada muestra de tejido, se demostró que su presencia es diferente según el tipo de tejido analizado. Es así que, el 55,81 % fueron aisladas de rama madura y el 44,19 % de rama joven. Mientras que, el 57,36 % fueron de hojas y el 42,64 % de tallos. Los géneros *Trichoderma* y *Alternaria* fueron los más frecuentes con 22,48 % y 21,71 %, respectivamente; por el contrario, los géneros de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Stemphylium* se presentaron con menor frecuencia en plantas de vid con valores menores a 12,4 % (Cuadro 1).

Cuadro 1. Frecuencias absolutas y relativas de géneros de hongos endófitos asociados a ramas maduras y jóvenes, hojas y tallos de *Vitis vinifera* L. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú. 2022.

Table 1. Absolute and relative frequencies of genera of endophytic fungi associated with mature and young branches, leaves and stems of *Vitis vinifera* L. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú. 2022.

Géneros	Rama madura		Rama joven		Total	
	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo	FA	FR (%)
<i>Alternaria</i>	13	2	6	7	28	21,71
<i>Aspergillus</i>	4	1	1	5	11	8,53
<i>Cladosporium</i>	3	1	1	11	16	12,40
<i>Fusarium</i>	0	0	1	3	4	3,10
<i>Micelio Esteril</i>	12	5	11	5	33	25,58
<i>Nigrospora</i>	3	1	1	0	5	3,88
<i>Penicillium</i>	0	1	0	1	2	1,55
<i>Stemphylium</i>	0	0	1	0	1	0,78
<i>Trichoderma</i>	15	11	2	1	29	22,48
Total FA	50	22	24	33	129	100
Total FR (%)	38,76	17,05	18,6	25,58	100	

La presencia de los géneros de los hongos endófitos varía según el tipo de órgano de la planta, ambas variables no son independientes ($p=0,0005$) y están relacionadas con los tipos de ramas ($p=0,0009$). Es así que, los géneros *Trichoderma*, *Nigrospora* y *Alternaria* fueron los más frecuentes en ramas maduras con 89,66 %, 80,00 % y 53,57 %, respectivamente. Mientras que *Fusarium* y *Stemphylium* fueron los más frecuentes en ramas jóvenes (100 %), seguido de los géneros *Cladosporium* y *Aspergillus* con 75,00 % y 54,55 %, respectivamente. A nivel hojas, la mayor presencia de cepas de hongos endófitos fueron los géneros *Stemphylium*, *Nigrospora*, *Alternaria* y *Trichoderma* con valores superiores a 58,62 % en comparación con los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Aspergillus* fueron los más frecuentes en tallos con valores mayores a 54,55 % (Figura 2 y 3).

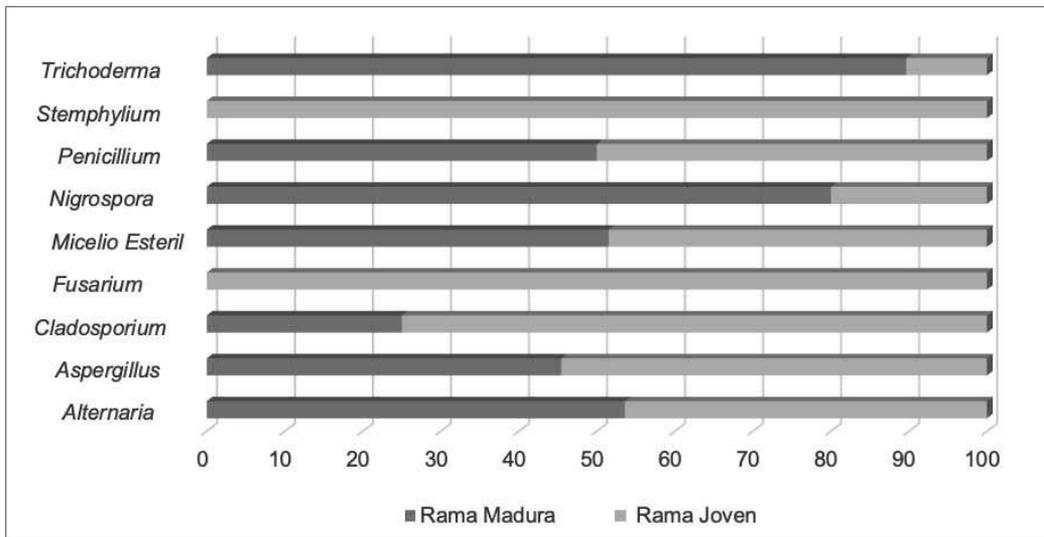


Figura 2. Frecuencia relativa porcentual de géneros de hongos endófitos aislados en ramas maduras y jóvenes de *Vitis vinifera* L. provenientes de lotes de producción de la provincia de Cañete, Perú. 2020.

Figure 2. Percentage relative frequency of genera of endophytic fungi isolated from young and mature branches of *Vitis vinifera* L. from production lots in the province of Cañete, Perú. 2020.

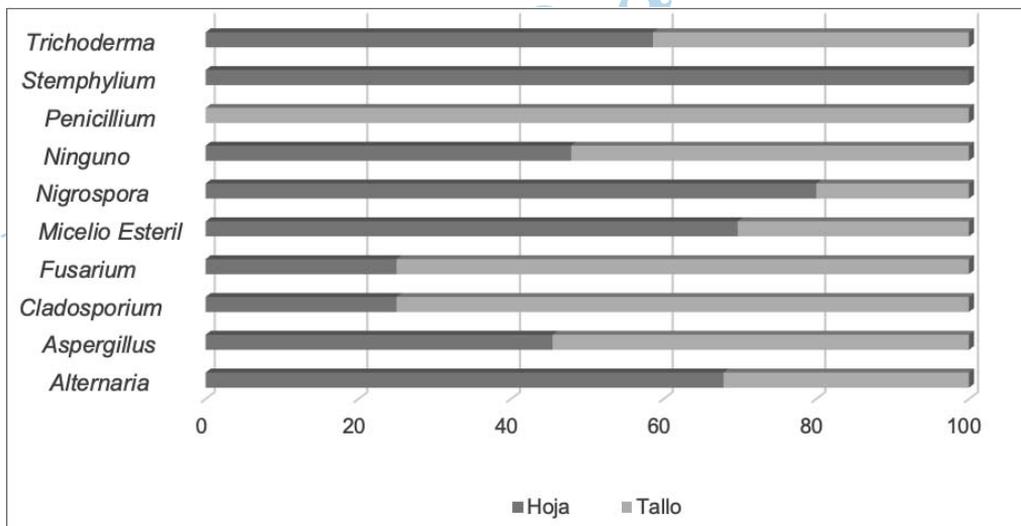


Figura 3. Frecuencia relativa porcentual de géneros de hongos endófitos aislados de hojas y tallos de *Vitis vinifera* L. provenientes de lotes de producción de la provincia de Cañete, Perú. 2020.

Figure 3. Percentage relative frequency of genera of endophytic fungi isolated from stems and leaves of *Vitis vinifera* L. from production lots in the province of Cañete, Perú. 2020.

Capacidad de antibiosis

Los metabolitos secundarios de cepas de hongos endófitos de *V. vinífera* variaron en su capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea* con valores de 4,08 a 51,01 %. La cepa HEVH -01 del género *Cladosporium* fue el que presentó la mayor inhibición micelial de *B. cinerea*, seguido del género *Alternaria* (cepas HEVH - 99 y HEVT - 70), *Aspergillus* (HEVH - 77) y *Nigrospora* (HEVH - 13) con valor mayor al 40,74 % de inhibición, sin diferencias significativas entre dichas cepas; mientras que, los metabolitos secundarios extraídos de las cepas HEVT - 51 y HEVT - 71 del género *Cladosporium* mostraron el menor efecto en la inhibición, al igual que las cepas de los géneros *Fusarium* (HEVH - 69) y *Penicillium* (HEVT - 04) con valores menores al 11,44 % de inhibición micelial, sin diferencias significativas entre las cepas (Figura 3). De igual forma, se observó que las cepas de los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma* presentaron una menor inhibición micelial del patógeno; sin embargo, las cepas HEVT- 88, HEVT -02 y HEVT-29 de los géneros mencionados, respectivamente, presentaron una ligera inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* en medio PDA con valores de 17,3, 21,76 y 25, respectivamente, en comparación con el testigo (sin metabolitos) (Figura 4).

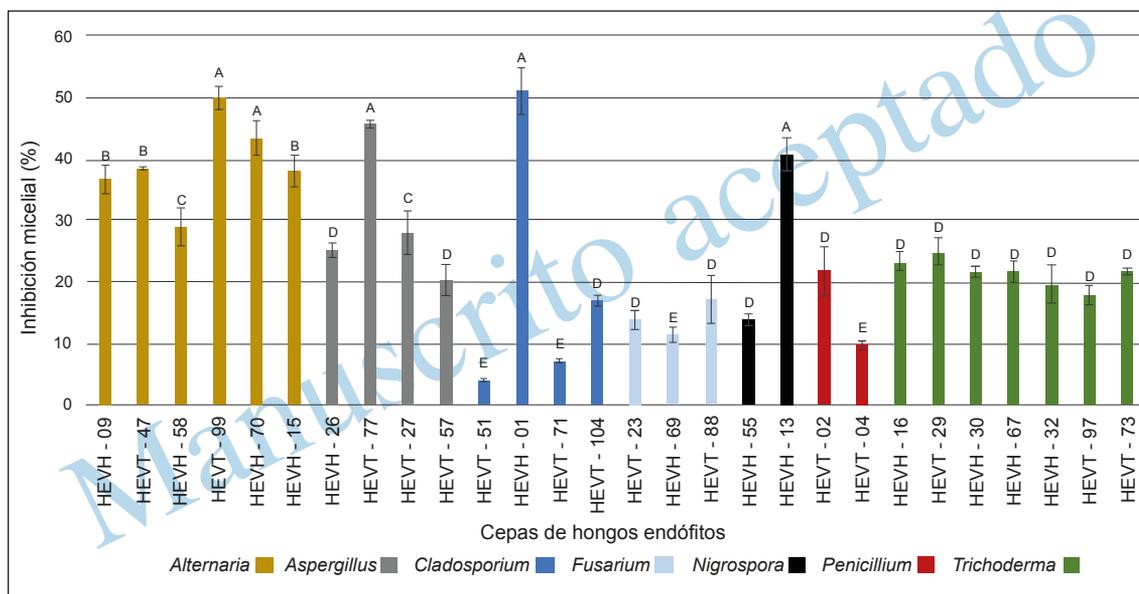
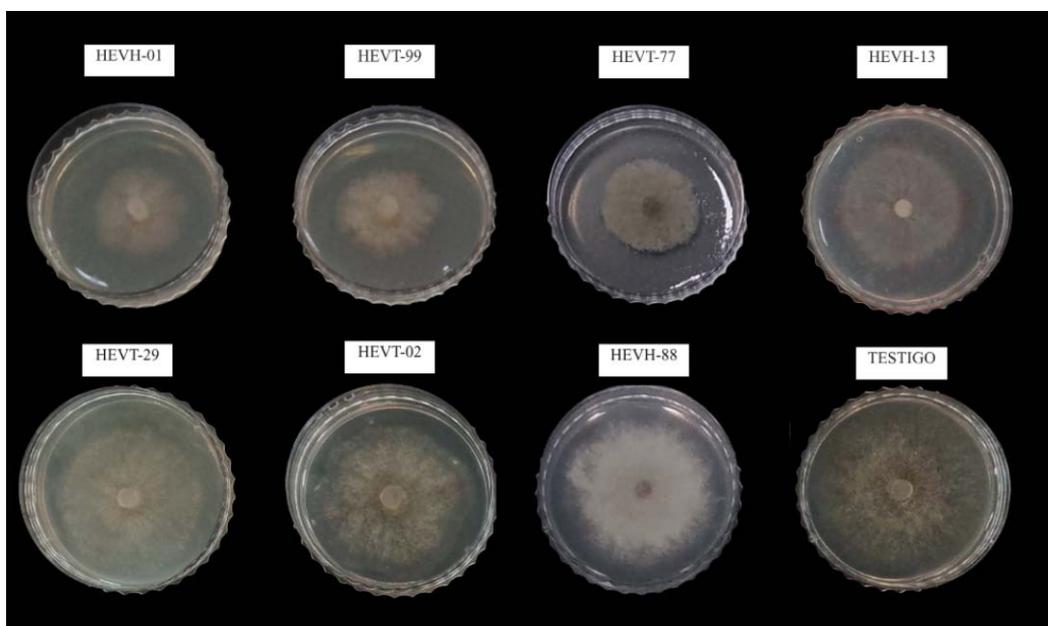


Figura 3. Inhibición de metabolitos secundarios producidos por cepas de hongos endófitos sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* en medio de cultivo PDA a las 72 h de incubación. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú. 2022.

HEVT: hongo endófito aislado del tallo de la vid. HEVH: hongo endófito aislado de hojas de la vid. Prueba de Scott-Knott (95 %), letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios de las cepas de hongos endófitos, con un nivel de significancia de 0,05.

Figure 3. Inhibition of secondary metabolites produced by endophytic fungal strains on the mycelial growth of *B. cinerea* in PDA culture medium after 72 h of incubation. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú. 2022.

HEVT: endophytic fungus isolated from the vine stem. HEVH: endophyte fungus isolated from vine leaves. Different letters indicate significant differences between the means of the endophytic fungal strains, with a significance level of 0.05.



Es 5,
revisar

Figura 4. Efecto de los metabolitos secundarios de cepas de hongos endófitos sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* en medio de cultivo PDA. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú, 2022.

Cepa HEVH -01 (*Cladosporium*), HEVH - 99 (*Alternaria*), *Aspergillus* (HEVH - 77), *Nigrospora* (HEVH - 13), *Trichoderma* (HEVT-29), *Penicillium* (HEVT-02) y *Fusarium* (HEVH-88).

Figure 4. Effect of the secondary metabolites of endophytic fungal strains on the mycelial growth of *B. cinerea* in PDA culture medium. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú, 2022.

Strain HEVH -01 (*Cladosporium*), HEVH - 99 (*Alternaria*), *Aspergillus* (HEVH - 77), *Nigrospora* (HEVH - 13), *Trichoderma* (HEVT-29), *Penicillium* (HEVT-02) and *Fusarium* (HEVH-88).

Discusión

Este estudio reporta la microbiota endófitas asociada a plantas de *V. vinifera* cultivadas en el Valle Cañete. Los tejidos vegetales están dominados por hongos asexuales, que representaron alrededor del 74 % del número total de cepas obtenidas. Se destaca que el número de cepas aisladas de las diversas partes de la planta no varió mucho entre las hojas y tallos, y entre las ramas jóvenes y adultas, así como se ha señalado en investigaciones anteriores (Aleynova et al., 2022; Casieri et al., 2009; González & Tello, 2011). La presencia de estos hongos en órganos específicos de la vid es probable que dependen del contenido de diferentes nutrientes, sales y metabolitos secundarios (Aleynova et al., 2022). Además, provienen del sistema de raíces a través de vasos conductores hacia el tallo y luego se mueven hacia la hoja, pueden moverse sistémicamente y colonizar otros órganos de la planta (Deyett & Rolshausen, 2020).

En este estudio las cepas de hongos endófitos habitaron los tejidos de la vid, pero la mayoría en las ramas maduras y hojas. También, estudios reportaron que el mayor número de aislamientos de hongos se detectó en las hojas (Aleynova et al., 2022; González & Tello, 2011) y la comunidad de hongos endófitos tiende a expandirse con la edad foliar (López-González et al., 2017). Se reportó que el mayor número de taxones estuvieron en las hojas de plantas sanas de trigo que en el resto de órganos analizados (Larran et al., 2000). En variedades de soja y maíz se

aisló un mayor número de endófitos de los tejidos del tallo (Russo et al., 2016). Los cambios en la diversidad de hongos endófitos pueden estar relacionados con la fisiología foliar (Fan et al., 2020).

La mayoría de las cepas de hongos endófitos en *V. vinifera* pertenecen a los géneros *Alternaria* y *Trichoderma* que habitan las hojas, y *Cladosporium* y *Trichoderma* en los tallos. Además, las cepas obtenidas en este estudio son considerados endófitos de vid, así como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium* fueron géneros de hongos endófitos más abundantes que se detectaron en *V. vinifera* y otros cultivos (Fan et al., 2020; Sadeghi et al., 2019). Cepas de *Alternaria* fueron identificadas como endófitos en vid (Cosoveanu et al., 2014), mientras que la cepa *A. verrucaria* SYE-1 fue obtenido de la uva silvestre china (uva de Amur) (Li et al., 2020). También, se aislaron otros antagonistas fúngicos del género *Trichoderma* (González & Tello, 2011). Especies de *Alternaria* se presentaron con alta frecuencia (Kecskeméti et al., 2016; Pancher et al., 2012). En *V. amurensis*, *Cladosporium* fue uno de los géneros de los hongos endófitos más comunes que habitaban tallos y hojas (Aleynova et al., 2022) lo que concuerda con los resultados de este estudios. Pero, *Cladosporium* fue uno de los géneros que se aislaron con mayor frecuencia de las hojas de *Glycine max* (Gomes Fernandes et al., 2015). En cambio, *Cladosporium cladosporioides* fue reportado de manera esporádica en hojas sanas de *Caesalpinia echinata* Lam. (Feijó de Lima & da Silva Cavalcanti, 2014). También se reportaron en las hojas de *Vaccinium dunalianum* var. *Urophyllum* la mayor diversidad de hongos endófitos y el género *Cladosporium* fue encontrado en ramas (Li et al., 2016). Por consiguiente, se confirmaría que los géneros identificados en esta investigación son hongos endófitos. Además, los metabolitos obtenidos de algunas cepas de los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Nigrospora* presentaron la mayor inhibición micelial de *B. cinerea* y se podrían considerar como posibles candidatos de biocontrol de enfermedades de la vid, así como cepas de *A. verrucaria* contra *B. cinerea*, controlaron el moho gris de la uva (Li et al., 2020), *A. alternata* del mildiú veloso de la uva (*Plasmopara viticola*) (Musetti et al., 2006) y *Alternaria* sp. inhibió el desarrollo de *B. cinerea* (Cosoveanu et al., 2014). También, especies de *Alternaria* como potencial agente de biocontrol de patógenos de plantas (Lou et al., 2013) y contra algunas plagas agrícolas (Sharma & Sharma, 2014). Se aislaron cuatro metabolitos secundarios antifúngicos de cultivos líquidos de *Nigrospora* sp. cepa LLGLM003, un hongo endofítico aislado de la planta medicinal *Moringa oleifera* Lam. De y se mostró que la griseofulvina mostraba inhibición del crecimiento micelial de ocho hongos patógenos de plantas (Zhao et al., 2012).

En recientes investigaciones, el hongo endófito, *Aspergillus fumigatus* exhibió el 77 % de inhibición del crecimiento de *A. flavus*, también redujo la producción de aflatoxinas AFB 1 (Abdelaziz et al., 2022). De igual modo, especies de *Aspergillus* inhiben el crecimiento de varias especies de *Phytophthora* spp (El-Sayed & Ali, 2020). *Cladosporium omanense* se ha descrito como un nuevo hongo endofítico que tiene la capacidad de suprimir *Pythium aphanidermatum* (Halo et al., 2021).

La capacidad antimicótica puede atribuirse a la actividad de los metabolitos secretados (Brakhage, 2013). Esta supresión hacia *B. cinerea* podrían prevenir la germinación de conidios y el crecimiento de micelio como se reporta en esta investigación. También, se ha reportado que esos géneros poseen propiedades antifúngicas que son útiles contra una serie de enfermedades de las plantas (Brakhage, 2013; Cosoveanu et al., 2014; González & Tello, 2011; Leon-Ttacca et al., 2022). Se ha identificado una variedad de metabolitos bioactivos de *A. verrucaria* como productos naturales antimicrobianos, como las verrucamidas AD antibacterian (Sadeghi et al., 2019). Por consiguiente, las cepas aisladas de *V. vinifera* en el valle Cañete podrían ser posibles agentes de control biológico de plagas y enfermedades de la vid y otros cultivos.

Conclusiones

Los hongos endófitos asociados a la *V. vinífera* de los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Nigrospora*, suprimieron el crecimiento micelial de *B. cinerea*. Esta capacidad antifúngica puede ser eficaz para controlar el moho gris en otros cultivos.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Nacional de Cañete, Perú por el financiamiento del Proyecto de Investigación “Colecta de hongos endófitos con potencial de biocontrol del agente causal del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la vid (*Vitis vinífera*) en Cañete”.

Conflictos de interés

Los autores declaramos no tener conflicto de intereses.

Referencias

- Aleynova, O. A., Nityagovsky, N. N., Suprun, A. R., Ananov, A. A., Dubrovina, A. S., & Kiselev, K. V. (2022). The diversity of fungal endophytes from wild grape *Vitis amurensis* Rupr. *Plants*, *11*(21), Article 2897. <https://doi.org/10.3390/plants11212897>.
- Abdelaziz, A. M., El-Wakil, D. A., Attia, M. S., Ali, O. M., AbdElgawad, H., & Hashem, A. H. (2022). Inhibition of *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production in *Zea mays* L. Using Endophytic *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, *8*(5), Article. 482. <https://doi.org/10.3390/jof8050482>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th ed.). Macmillan Publishing Company.
- Barron, G. L. (1968). *The genera of Hyphomycetes from soil*. Baltimore. The Williams and Wilkins Co.
- Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(1), 21–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Busby, P., Ridout, M., & Newcombe, G. (2016). Fungal endophytes: Modifiers of plant disease. *Plant Molecular Biology review*, *90*, 645-655. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0412-0>
- Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O., & Gindro, K. (2009). Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinífera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, *48*(1), 73–83. <https://oajournals.fupress.net/index.php/pm/article/view/5268>
- Cosoveanu, A., Gimenez-Mariño, C., Cabrera, Y., Hernandez, G., & Cabrera, R. (2014). Endophytic fungi from grapevine cultivars in Canary Islands and their activity against phytopatogenic fungi. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, *7*(15), 1497-1503.
- De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Masiello, M., Gerin, D., Pollastro, S., & Faretra, F. (2014). Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. *Pest Management Science*, *70*(12), 1785-1796. <https://doi.org/10.1002/ps.3711>

- De Sousa Leite, T., Cnossen-Fassoni, A., Liparini Pereira, O., Mizubuti Gomide, E., Fernandes de Araújo, E., & Vieira de Queiroz, M. (2013). Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. *Journal of Microbiology*, *51*(1), 56-69. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-2356-x>
- Deyett, E., & Rolshausen, P. E. (2020). Endophytic microbial assemblage in grapevine. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(5), Article f1aa053. <https://doi.org/10.1093/femsec/f1aa053>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2008). *InfoStat software estadístico, Manual del Usuario: Vol. Grupo Infostat (1.1)*. Universidad Nacional de Córdoba.
- El-Sayed, A. S. A., & Ali, G. S. (2020). *Aspergillus flavipes* is a novel efficient biocontrol agent of *Phytophthora parasitica*. *Biological Control*, *140*, Article 104072. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104072>
- Fan, Y., Gao, L., Chang, P., & Li, Z. (2020). Endophytic fungal community in grape is correlated to foliar age and domestication. *Annals of Microbiology*, *70*(1), Article 30. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01574-9>
- Feijó de Lima, T. E., & da Silva Cavalcanti, M. (2014). Fungos endófitos e do filopiano de *Caesalpinia echinata* Lam da estação ecológica de Tapacurá, PE. *Agrotropica*, *26*(1), 43-50. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/revista-agrotropica/artigos/2014-DOI-10.21757/0103-3816-2014v26n1p43-50.pdf>
- Gomes Fernandes, E., Liparini Pereira, O., Cãnedo da Silva, C., Pereira Bento, C. B., & Vieira de Queiroz, M. (2015). Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. *Microbiological Research*, *181*, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.010>
- González, V., & Tello, M. L. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, *47*(1), 29-42. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0073-x>
- Halo, B. A., Al-Yahyai, R. A., & Al-Sadi, A. M. (2021). Biological control of - *Pythium aphanidermatum* induced cucumber and radish damping-off by an endophytic fungus, *Cladosporium omanense* isolate 31R. *Biocontrol science and technology*, *31*(3), 235-251. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1844148>
- Keckskeméti, E., Berkelmann-Löhnertz, B., & Reineke, A. (2016). Are Epiphytic microbial communities in the carposphere of ripening grape clusters (*Vitis vinifera* L.) different between conventional, organic, and biodynamic grapes? *PLoS ONE*, *11*(8), Article e0160852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160852>
- Kernaghan, G., Mayerhofer, M., & Griffin, A. (2017). Fungal endophytes of wild and hybrid *Vitis* leaves and their potential for vineyard biocontrol. *Canadian Journal of Microbiology*, *63*(7), 583-595. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0740>
- Kouipou Toghueo, R. M., Eke, P., Zabalgoceazcoa, Í., Rodríguez Vázquez de Aldana, B., Wakam Nana, L., & Fekam Boyom, F. (2016). Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of common bean root rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*, *96*, 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.008>
- Larran, S., Mónaco, C., & Alippi, H. E. (2000). Endophytic fungi in beet (*Beta vulgaris* var. *esculenta* L.) leaves. *Advances in Horticultural Science*, *14*(4), 193-196. <https://www.jstor.org/stable/42883275>
- Leon-Ttacca, B., Yactayo-Yataco, R. J., Astete-Farfán, A., & Mattos, L. L. (2022). Antibiosis and mycoparasitism of endophytic fungi on the causal agent of blueberry gray mold (*Botrytis cinerea*). *Bioagro*, *34*(2), 209-220. <http://www.doi.org/10.51372/bioagro343.1>

- Li, Z., Chang, P., Gao, L., & Wang, X. (2020). The endophytic fungus *Albifimbria verrucaria* from wild grape as an antagonist of *Botrytis cinerea* and other grape pathogens. *Phytopathology*, 110(4), 843-850. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-19-0347-R>
- Li, Z. -J., Shen, X. -Y., & Hou, C. -L. (2016). Fungal endophytes of South China blueberry (*Vaccinium dunalianum* var. *Urophyllum*). *Letters in Applied Microbiology*, 63(6), 482-487. <https://doi.org/10.1111/lam.12673>
- López-González, R. C., Gómez-Cornelio, S., De la Rosa-García, S. C., Garrido, E., Oropeza-Mariano, O., Heil, M., & Partida-Martínez, L. P. (2017). The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecology*, 26, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.11.004>
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., & Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*, 18(5), 5891-5935. <https://doi.org/10.3390/molecules18055891>
- Lugtenberg, B. J. J., Caradus, J. R., & Johnson, L. J. (2016). Fungal endophytes for sustainable crop production. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(12), Article fiw194 <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw194>
- Musetti, R., Vecchione, A., Stringher, L., Borselli, S., Zulini, L., Marzani, C., D'Ambrosio, M., di Toppi, L. S., & Pertot, I. (2006). Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 96(7), 689-698. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0689>
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., Pertot, I., & Campisano, A. (2012). Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4308-4317. <https://doi.org/10.1128/AEM.07655-11>
- Reis Varanda, C. M., Oliveira, M., Materatski, P., Landum, M., Esteves Clara, M. I., & Félix, M. do R. (2016). Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biology*, 120(12), 1525-1536. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.08.002>
- Russo, M. L., Pelizza, S. A., Cabello, M. N., Stenglein, S. A., Vianna, M. F., & Scorsetti, A. C. (2016). Endophytic fungi from selected varieties of soybean (*Glycine max* L. Merr.) and corn (*Zea mays* L.) grown in an agricultural area of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(2), 154-160. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.11.006>
- Sadeghi, F., Samsampour, D., Seyahoei, M. A., Bagheri, A., & Soltani, J. (2019). Diversity and spatiotemporal distribution of fungal endophytes associated with *Citrus reticulata* cv. Siyahoo. *Current Microbiology*, 76(3), 279-289. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01632-9>
- Sánchez-Fernández, E. R., Sánchez-Ortiz, L. B., Sandoval-Espinosa, M. Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, C. M., & Macías-Rubalcava, L. M. (2013). Hongos endófitos: Fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
- Shankar Mane, R., Milaap Paarakh, P., & Basapps Vedamurthy, A. (2018). Brief review on fungal endophytes. *International Journal of Secondary Metabolite*, 5(4), 288-303 <https://doi.org/10.21448/ijsm.482798>
- Sharma, I., & Sharma, A. (2014). Use of *Alternaria* spp. as a pest control agent: A Review. *World Applied Sciences Journal*, 11(31), 1869-1872. h

- Stranska, M., Dzuman, Z., Prusova, N., Behner, A., Kolouchova, I., Lovecka, P., Rezanka, T., Kolarik, M., & Hajslova, J. (2022). Fungal endophytes of *Vitis vinifera*—Plant growth promoters or potentially toxinogenic agents? *Toxins*, *14*(2), Article 66. <https://doi.org/10.3390/toxins14020066>
- Watanabe, T. (2002). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species*. (2nd ed.). CRC PRESS.
- Zhao, J. H., Zhang, Y. L., Wang, L. W., Wang, J. Y., & Zhang, C. L. (2012). Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(5), 2107-2112. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1015-4>

Manuscrito aceptado