



## Biocontrol de *Penicillium digitatum* con metabolitos secundarios de hongos endófitos en frutos de mandarina\*

### Biocontrol of *Penicillium digitatum* with secondary metabolites of endophytic fungi in mandarin fruits

Betsabe Leon-Ttacca<sup>1</sup>, Yasmin Arestegui-Cantoral<sup>1</sup>, Brandy Tarula-Gutierrez<sup>1</sup>, Cesar Orellana-Cornejo<sup>1</sup>,  
Jorge Luis-Vilcamiza<sup>1</sup>, Pedro Flores-Pelaez<sup>1</sup>

\* Recepción: 13 de julio, 2023. Aceptación: 6 de noviembre, 2023. Este trabajo formó parte de los resultados del proyecto de investigación “Prospección de enfermedades fúngicas en cítricos en el valle de Cañete y su biocontrol *in vitro*” realizado por el semillero de investigación “Control biológico de enfermedades en plantas” en el laboratorio de Sanidad Vegetal, Escuela Profesional de Agronomía, Universidad Nacional de Cañete (UNDC). Casa de la Cultura, Av. Mariscal Benavides, San Luis de Cañete 15701. Lima, Perú.

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Cañete, Escuela Profesional de Agronomía. Lima, Perú. [bleon@undc.edu.pe](mailto:bleon@undc.edu.pe) (autora para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0002-4343-2431>), [aresteguiyc@gmail.com](mailto:aresteguiyc@gmail.com) (<https://orcid.org/0000-0001-8016-9161>), [brandy.tarula.55@gmail.com](mailto:brandy.tarula.55@gmail.com) (<https://orcid.org/0009-0006-6640-2493>), [cesargermanorellanacornejo@gmail.com](mailto:cesargermanorellanacornejo@gmail.com) (<https://orcid.org/0009-0003-6717-8567>), [jorgelv1717@gmail.com](mailto:jorgelv1717@gmail.com) (<https://orcid.org/0000-0003-2601-2467>), [flores12\\_12@outlook.com](mailto:flores12_12@outlook.com) (<https://orcid.org/0000-0002-5149-1984>).

## Resumen

**Introducción.** El “moho verde” causado por *Penicillium digitatum* es uno de los problemas fitosanitarios que limita la producción en los cítricos. Para su control se utilizan fungicidas sintéticos, que han perdido eficacia, debido a la resistencia generada por el hongo. Una alternativa, es el uso de hongos endófitos con acción biocontroladora. **Objetivo.** Evaluar el efecto de metabolitos secundarios (MS) de hongos endófitos (HE) en la inhibición micelial de *Penicillium digitatum* y la eficacia de control de la enfermedad, en frutos de mandarina (*Citrus reticulata*) después de la cosecha. **Materiales y métodos.** El estudio se realizó en 2022, bajo un diseño experimental completo al azar, en el laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete (UNDC), Lima, Perú. Para la prueba de antibiosis se extrajeron los metabolitos secundarios de diez cepas de HE de los géneros *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. y *Aspergillus* sp., en donde se evaluó la inhibición micelial del patógeno (%). Se asperjaron MS a una concentración del 15 % (v/v) sobre frutos de mandarina que fueron desinfectados e inoculados con el patógeno por aspersión ( $1 \times 10^5$  UFC/cc). Adicionalmente, se utilizaron un biocontrol comercial, un aceite vegetal y un fungicida. Después de 6 y 9 días, se evaluaron la incidencia (%) y el índice de severidad (0,1,2,3) de la enfermedad. **Resultados.** Los metabolitos secundarios de las cepas HEA-111 (*Aspergillus*), HEA-109 (*Fusarium*) y HSA-1 (*Trichoderma*) presentaron la mayor inhibición micelial con 95,05 %, 87,51 % y 47,47 %, respectivamente. En los frutos de mandarina tratados con los MS de las cepas HEA-109 y HSA-1, hubo un control del 80 % y 55 %, respectivamente. **Conclusiones.** Los MS de HE tuvieron efecto en la inhibición micelial de *P. digitatum* y redujeron el avance de la enfermedad en frutos de mandarina después de la cosecha.

**Palabras clave:** moho, antibiosis, control biológico, antagonismo.



## Abstract

**Introduction.** “Green mold,” caused by *Penicillium digitatum* is one of the phytosanitary issues that limits citrus production. For its control, synthetic fungicides are used, which have lost effectiveness due to resistance developed by the fungus. An alternative is the use of endophytic fungi with biocontrol action. **Objective.** To evaluate the effect of secondary metabolites (SM) from endophytic fungi (EF) on the mycelial inhibition of *Penicillium digitatum* and the effectiveness of disease control in mandarin fruits (*Citrus reticulata*) post-harvest. **Materials and methods.** The study was conducted in 2022, using a completely randomized experimental design in the Plant Health Laboratory at the Universidad Nacional de Cañete (UNDC), Lima, Peru. For the antibiosis test, secondary metabolites were extracted from ten strains of EF from the genera *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., and *Aspergillus* sp., where mycelial inhibition of the pathogen (%) was evaluated. SMs were sprayed at 15 % (v/v) concentration on mandarin fruits that were disinfected and inoculated with the pathogen by spraying ( $1 \times 10^5$  CFU/cc). Additionally, a commercial biocontrol, a vegetable oil, and a fungicide were used. After 6 and 9 days, disease incidence (%) and severity index (0, 1, 2, 3) were evaluated. **Results.** Secondary metabolites from strains the HEA-111 (*Aspergillus*), HEA-109 (*Fusarium*), and HSA-1 (*Trichoderma*) showed the highest mycelial inhibition with 95.05 %, 87.51 %, and 47.47 %, respectively. In mandarin fruits treated with SMs from strains HEA-109 and HSA-1, there was a control of 80 % and 55 %, respectively. **Conclusions.** SMs from EF were effective in inhibiting the mycelial growth of *P. digitatum* and reduces disease progression in mandarin fruits post-harvest.

**Keywords:** mold, antibiosis, biological control, antagonism.

## Introducción

El género *Citrus*, comprende algunos de los cultivos frutales más cultivados en todo el mundo, incluye un número incierto de especies como naranjas, mandarinas, limas, limones, toronjas y otros (Wu et al., 2018). Son cultivos muy importantes en el Perú, debido a su elevada exportación hacia mercados internacionales, entre los principales departamentos productores de cítricos están: Piura, Lambayeque, Lima, Ica, Junín y Cusco (Ministerio de Agricultura [MINAG], 2023). Los principales mercados mundiales (Estados Unidos, Europa y Asia), muestran una fuerte demanda de cítricos de Perú, en su mayoría de mandarinas sin semillas (Agraria.pe, 2023). Los cítricos son susceptibles a diversos patógenos durante la poscosecha y el transporte, lo que provoca descomposición, deterioro y, por ende, pérdidas económicas (Talibi et al., 2014).

El moho verde causado por *Penicillium digitatum*, es una importante enfermedad fungosa que daña la calidad del fruto, es responsable de hasta el 90 % de pérdidas del fruto cosechado (Costa et al., 2019). El control de esta enfermedad se logra mediante la aplicación masiva de fungicidas. Sin embargo, su uso indiscriminado tiene implicaciones para la salud y la contaminación ambiental. Los antagonistas microbianos, como los endófitos, son una alternativa prometedora a los fungicidas sintéticos (Li et al., 2022; Wang et al., 2022).

Los hongos endófitos son un grupo de microorganismos que habitan de forma asintomática dentro de todas las plantas; actúan como agentes de control biológico y protegen a la planta de infecciones durante todo su ciclo de vida (Segaran & Sathivelu, 2019). Como agentes de biocontrol ofrecen inmensas posibilidades para el desarrollo de biofungicidas seguros y ecológicos, debido a los modos de acción utilizados contra los fitopatógenos, tales como: antibiosis, micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes, y resistencia inducida (Gupta & Saxena, 2023). Además, confieren resistencia contra estreses abióticos, generan respuesta de defensa contra el ataque de insectos y patógenos, y promueven el crecimiento vegetal (Khare et al., 2018).

Estos microorganismos son capaces de producir diversas moléculas bioactivas y metabolitos que se aplican en la medicina, la agricultura y la industria (Khare et al., 2018; Nicoletti & Fiorentino, 2015). Estos metabolitos

poseen una excelente actividad antifúngica contra los fitopatógenos y pueden ser de naturaleza volátil o no volátil (Deshmukh et al., 2018). Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son compuestos que tienen una alta presión de vapor y baja solubilidad en agua, mientras que los metabolitos no volátiles son aquellos que se tardan en vaporizar (Gupta & Saxena, 2023).

La aplicación de hongos endófitos con capacidad antifúngica, puede ayudar a contrarrestar los efectos negativos de los fungicidas sintéticos y permitiría que sean empleados dentro de un plan de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE) para el cultivos, como el de mandarina sería una alternativa respetuosa con el ambiente, lo que aumentaría la posibilidad de acceder a mercados internacionales más exigentes. Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de metabolitos secundarios (MS) de hongos endófitos (HE) en la inhibición micelial de *Penicillium digitatum* y la eficacia de control de la enfermedad, en frutos de mandarina después de la cosecha.

## Materiales y métodos

### Ubicación del experimento

El experimento se ejecutó en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Escuela de Agronomía de la Universidad Nacional de Cañete (UNDC), en el año 2022, ubicado en el distrito de Imperial, provincia de Cañete, departamento de Lima, Perú (13°3' S, 76°21' W, 85 m s. n. m.).

### Aislamiento de *Penicillium digitatum*

Se recolectaron muestras de frutos de mandarina (*Citrus reticulata*) var. Satsuma owari con síntomas y signos de moho verde (*Penicillium digitatum*), las cuales fueron llevados al laboratorio de Sanidad Vegetal de la UNDC. A las muestras se les extrajo una pequeña porción apical de hifas y conidias de la zona con esporulación, que fue depositada en placas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA), para obtener un cultivo axénico del hongo (Apolonio-Rodríguez et al., 2017). Para la identificación de *Penicillium digitatum* se realizaron observaciones de las características culturales de la colonia y microscópicas. Se utilizaron las claves de Barnett y Hunter (1998), Barron (1968) y Gómez de Membrillera (1950), para identificación a nivel de especie.

### Obtención de hongos endófitos

Las cepas de hongos endófitos fueron proporcionadas por el laboratorio de Sanidad Vegetal de la UNDC. Estas fueron aisladas de hojas, tallos y raíz de plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum*) y papa (*Solanum tuberosum*), de la región de Ica y Lima, Perú (Leon Ttacca et al., 2022), y conservadas en solución de glicerina al 20 %, a una temperatura de -20 °C (Almaraz Sanchez et al., 2019). Para esta investigación se reactivaron diez cepas (Cuadro 1) en placas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a una temperatura de 25 °C por una semana.

### Prueba de antibiosis

Se produjeron metabolitos secundarios, solubles e inhibitorios de las diez cepas de hongos endófitos, según la metodología empleada por Leon-Ttacca et al. (2022). Estas cepas se sembraron en placas Petri con medio PDA y se incubaron a 25 °C durante siete días. Transcurrido el tiempo, se obtuvo una suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>), 1 ml de esta suspensión fue depositado en matraces con caldo de papa más sacarosa (100 ml). Tres matraces por cada cepa se incubaron a 25 °C en agitación a 110 rpm por siete días, luego el micelio fue removido por filtración en la

**Cuadro 1.** Origen de las cepas de hongos endófitos empleadas en la investigación. Laboratorio de Sanidad Vegetal. Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú, 2022.

**Table 1.** Origin of the endophytic fungal strains used in the research. Plant Health Laboratory. Universidad Nacional de Cañete, Lima, Peru, 2022.

Nº	Cepas	Especie (órgano)	Lugar de origen (distrito, provincia y región) en Perú	Género de HE
1	HE- ArR-1	<i>V. corymbosum</i> (Raíz)	Pisco, Pisco, Ica	<i>Trichoderma sp.</i>
2	HE- ArR-3	<i>V. corymbosum</i> (Raíz)	Pisco, Pisco, Ica	<i>Trichoderma sp.</i>
3	HE- ArR-7	<i>V. corymbosum</i> (Raíz)	Pisco, Pisco, Ica	<i>Trichoderma sp.</i>
4	HE-ArR-92	<i>V. corymbosum</i> (Raíz)	Roma, Cañete, Lima	<i>Trichoderma sp.</i>
5	HE-ArT-161	<i>V. corymbosum</i> (Tallo)	Pisco, Pisco, Ica	<i>Trichoderma sp.</i>
6	HE- PaT-7	<i>S. tuberosum</i> (Tallo)	Gorgor, Cajatambo, Lima	<i>Trichoderma sp.</i>
7	HE-PaH-13	<i>S. tuberosum</i> (Hoja)	Gorgor, Cajatambo, Lima	<i>Trichoderma sp.</i>
8	TH	-	Comercial	<i>T. harzianum</i>
9	HE-ArT-111	<i>V. corymbosum</i> (Tallo)	Pisco, Pisco, Ica	<i>Fusarium sp.</i>
10	HE- ArT-109	<i>V. corymbosum</i> (Tallo)	Pisco, Pisco, Ica	<i>Aspergillus sp.</i>

cabina de flujo, el caldo filtrado se centrifugó por 5 min a 3000 rpm, el sobrenadante se colocó en baño maría a 90 °C por una hora, luego se añadió un volumen igual de PDA (2x de agar) y se transfirieron en placas Petri de 60x15 mm (tres repeticiones por filtrado). En el centro de las placas se inoculó un disco de 5 mm del patógeno *Penicillium digitatum* de una edad de crecimiento de siete días; las placas con el inóculo fueron incubadas a una temperatura de 25 °C por cinco días. Para los controles (testigo) se siguió el mismo procedimiento, se emplearon filtrados sin HE (solo caldo de papa más sacarosa). La evaluación se realizó cuando el patógeno colonizó las placas de los testigos. Con ayuda de un vernier digital se registraron las medidas del crecimiento radial de la colonia (mm) del patógeno en cuatro radios de las placas. El porcentaje de inhibición micelial se calculó con la ecuación 1 (Zhang, He, et al., 2022).

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

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

### Biocontrol del moho verde (*Penicillium digitatum*) con metabolitos secundarios en frutos de mandarina en condiciones de laboratorio

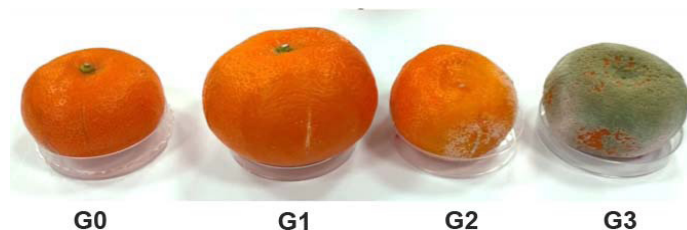
Se recolectaron frutos sanos de mandarina variedad satsuma de una plantación de cuatro años ubicada en el distrito de San Vicente de Cañete, estos fueron transportados con el mayor cuidado posible sin causar heridas hacia el laboratorio de Sanidad Vegetal de la UNDC. Los frutos se lavaron con agua potable, luego se les desinfectó la superficie con hipoclorito de sodio al 2 % por 5 min y enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (Zhang, Yin, et al., 2022). Para su secado se colocaron dentro de la cámara de siembra sobre papel toalla. Luego, con una aguja estéril se realizaron cuatro heridas superficiales (1 cm de largo) en cuatro puntos equidistantes de cada fruto, para la inoculación del patógeno. Con un atomizador manual, se asperjó una suspensión de esporas del patógeno ( $1 \times 10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>) sobre los frutos, se dejó en incubación por cuatro horas dentro de cajas plásticas, luego se aplicaron los metabolitos secundarios al 15 % sobre la superficie de los frutos inoculados por aspersión. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones, cinco frutos por repetición. Los frutos fueron colocados sobre placas Petri dentro de una cámara húmeda (caja plástica con algodón empapado con ADE), se dejaron en incubación durante nueve días a temperatura ambiente (23 °C ± 2) y se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad.

## Evaluación de la incidencia y severidad del moho verde (*Penicillium digitatum*) en frutos de mandarina

Para medir la incidencia, se evaluaron los síntomas y signos en las heridas de los frutos con relación al total de frutos, el resultado se expresó en porcentaje. Para la severidad se empleó una escala de índice de daño (Cocco et al., 2008) y fue adaptada a una escala gráfica en grados (Figura 1): Grado 0 (sin infección), Grado 1 para alteraciones leves (infección sin esporulación), Grado 2 para alteraciones moderadas (esporulación menor al 50 % del tejido afectado) y Grado 3 para alteraciones severas (esporulación mayor al 50 % del tejido afectado). La incidencia, severidad y eficiencia de control de la enfermedad fue calculado con las ecuaciones 2, 3 y 4, respectivamente (Zhang, He, et al., 2022).

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de heridas con infección}}{\text{Total de heridas heridas}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de heridas con infección}}{\text{Total de heridas heridas}} \times 100 \quad (3)$$



**Figura 1.** Escala gráfica para la evaluación del grado de severidad del moho verde (*Penicillium digitatum*) de la mandarina (*Citrus reticulata*). Laboratorio de Sanidad Vegetal. Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú, 2022.

**Figure 1.** Graphical scale for assessing the severity of green mold (*Penicillium digitatum*) on mandarins (*Citrus reticulata*). Plant Health Laboratory. Universidad Nacional de Cañete, Lima, Peru, 2022.

$$\text{Eficiencia de control (\%)} = \frac{\text{Incidencia del control} - \text{Incidencia del tratamiento}}{\text{Incidencia del control}} \times 100 \quad (4)$$

### Análisis estadístico

El experimento se condujo bajo un diseño completamente al azar con doce tratamientos (HE) y tres repeticiones. Los datos fueron analizados en el software estadístico InfoStat, versión 2008 (Di Rienzo et al., 2008), estos cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se realizó un análisis de varianza y la prueba de rango múltiple de Duncan, con un nivel de significancia de 0,05.

## Resultados

### Efecto de metabolitos secundarios (MS) de hongos endófitos (HE) en la inhibición micelial de *Penicillium digitatum*

En los ensayos *in vitro*, los metabolitos secundarios (MS) de diez cepas de hongos endófitos variaron en la inhibición micelial de *P. digitatum* sobre medio PDA en comparación con el testigo, donde siguió creciendo el patógeno (Figura 2). Los MS de las cepas HE-Art-111 (*Aspergillus*) y HE-Art-109 (*Fusarium*), mostraron un efecto potencial de inhibición sobre el crecimiento micelial del patógeno con 95,05 % y 87,51 %, respectivamente, con un comportamiento similar a los tratamientos a base de fungicida y aceite vegetal, los que inhibieron por completo

el crecimiento micelial del patógeno. La cepa comercial (*T. harzianum*) y HE-ArR-1, inhibieron en un 64,98 % y 47,48 %, respectivamente, en comparación con el resto de cepas que tuvieron un menor efecto con valores menores a 33,2 % de inhibición micelial del patógeno (Figura 3).

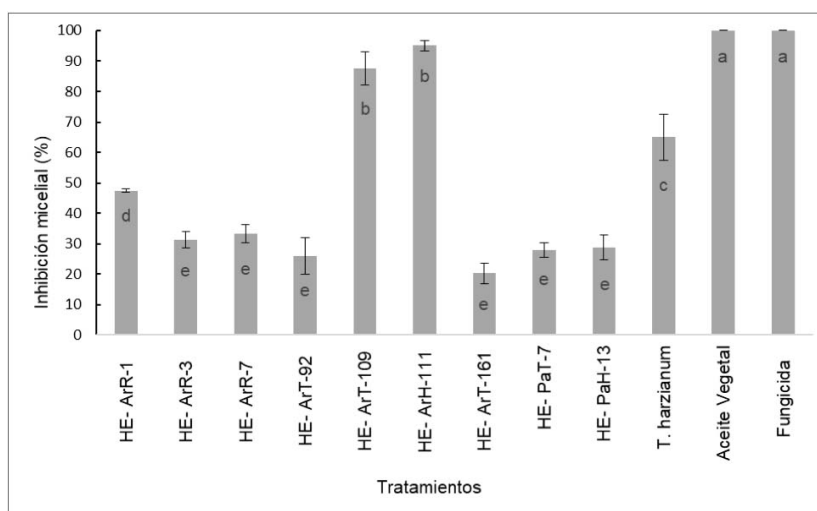


**Figura 2.** Efecto de metabolitos secundarios de cepas de hongos endófitos sobre el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú. 2022.

Hongos endófitos (HE) aislados de tejidos de raíz (R), tallo (T) y hoja (H) de plantas de arándano (Ar) y papa (Pa). Cepas 1, 3, 7, 92, 161, 7, 13 pertenecen al género *Trichoderma*, 109 a *Fusarium*; y 111 a *Aspergillus*.

**Figure 2.** Effect of secondary metabolites of endophytic fungal strains on the mycelial growth of *Penicillium digitatum*. Plant Health Laboratory, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Peru. 2022.

Endophytic fungi (HE) isolated from root (R), stem (T), and leaf (H) tissues of blueberry (Ar) and potato (Pa) plants. Strains 1, 3, 7, 92, 161, 7, 13 belong to the genus *Trichoderma*; 109 to *Fusarium*; and 111 to *Aspergillus*.



**Figura 3.** Crecimiento micelial de *Penicillium digitatum* en papa dextrosa agar (PDA) con metabolitos secundarios de cepas de hongos endófitos. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú. 2022.

Hongos endófitos (HE) aislados de tejidos de raíz (R), tallo (T) y hoja (H) de plantas de arándano (Ar) y papa (Pa). Cepas 1, 3, 7, 92, 161, 7, 13 pertenecen al género *Trichoderma*, 109 a *Fusarium*; y 111 a *Aspergillus*.

**Figure 3.** Mycelial growth of *Penicillium digitatum* on potato dextrose agar (PDA) with secondary metabolites from endophytic fungal strains. Plant Health Laboratory, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Peru. 2022.

Endophytic fungi (HE) isolated from root (R), stem (T), and leaf (H) tissues of blueberry (Ar) and potato (Pa) plants. Strains 1, 3, 7, 92, 161, 7, 13 belong to the genus *Trichoderma*; 109 to *Fusarium*; and 111 to *Aspergillus*.

## Eficacia de biocontrol de metabolitos secundarios de hongos endófitos sobre el moho verde (*P. digitatum*) en frutos de mandarina durante la poscosecha

A los seis y nueve días de almacenamiento, los frutos tratados con agua destilada e inoculados con esporas de *P. digitatum* presentaron una incidencia de la enfermedad del 100 % (Testigo), comparado con los frutos de mandarina tratados con metabolitos secundarios que redujeron el desarrollo de la enfermedad (Figura 4). Los MS de la cepa HE-ArT-109 del género *Fusarium*, fueron los que mejor controlaron la infección del patógeno sobre las heridas del fruto, seguido de cepa HE – ArR-1 del género *Trichoderma*; sin embargo, los MS de las demás cepas llegaron a presentar incidencia y severidad mayor a 55 % y 41,6 %, respectivamente (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Efecto de metabolitos secundarios de hongos endófitos en la incidencia y severidad del moho verde (*Penicillium digitatum*) en frutos de mandarina (*Citrus reticulata*) a los 6 y 9 días de almacenamiento. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú. 2022.

**Table 2.** Effect of secondary metabolites from endophytic fungi on the incidence and severity of green mold (*Penicillium digitatum*) on mandarin fruits (*Citrus reticulata*) after 6 and 9 days of storage. Plant Health Laboratory, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Peru. 2022.

Tratamientos	Incidencia (heridas infectadas) (%)				Severidad (%)			
	6 días		9 días		6 días		9 días	
HE- ArR-1	35	(± 8,75) bcd	45	(± 10,17) cde	16,67	(± 4,48) cde	35,0	(± 10,00) def
HE- ArR-3	45	(± 8,12) bcd	65	(± 12,65) bcd	31,67	(± 6,17) bc	53,2	(± 8,48) cd
HE- ArR-7	50	(± 4,74) bc	65	(± 8,75) abcd	40,00	(± 5,48) b	51,6	(± 5,10) cd
HE- ArR-92	50	(± 6,71) bc	70	(± 12,0) abc	33,33	(± 6,45) bc	60,0	(± 11,71) bc
HE- ArT-109	15	(± 7,35) de	20	(± 8,46) e	8,33	(± 4,72) de	16,8	(± 7,48) ef
HE- ArT-111	85	(± 12,0) a	90	(± 9,00) ab	68,33	(± 10,55) a	83,4	(± 11,63) ab
HE- ArT-161	55	(± 5,61) b	80	(± 7,35) ab	30,00	(± 3,61) bcd	70,0	(± 6,55) bc
HE- PaT-7	40	(± 9,95) bcd	70	(± 14,70) abc	25,00	(± 7,01) bcd	63,2	(± 7,86) bc
HE- PaH-13	50	(± 6,71) bc	55	(± 11,22) bcd	30,00	(± 7,48) bcd	41,6	(± 8,74) cde
<i>T. harzianum</i>	55	(± 10,17) bc	85	(± 9,49) ab	28,33	(± 6,39) bcd	58,4	(± 10,20) bcd
Aceite vegetal	25	(± 6,00) cde	35	(± 9,49) de	10,00	(± 4,69) de	21,8	(± 6,60) ef
Fungicida	5	(± 3,67) e	10	(± 7,35) e	1,67	(± 2,12) e	5,0	(± 5,14) f
Testigo	100	(± 0,00) a	100	(± 0,00) a	81,67	(± 3,64) a	98,4	(± 3,40) a

Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ( $p < 0,05$ ). / Different letters indicate significant difference according to Duncan's multiple range test ( $p < 0,05$ ).

Hongos endófitos (HE) aislados de tejidos de raíz (R), tallo (T) y hoja (H) de plantas de arándano (Ar) y papa (Pa). Cepas 1, 3, 7, 92, 161, 7, 13 pertenecen al género *Trichoderma*, 109 a *Fusarium*, y 111 a *Aspergillus*. / Endophytic fungi (HE) isolated from root (R), stem (T), and leaf (H) tissues of blueberry (Ar), and potato (Pa) plants. Strains 1, 3, 7, 92, 161, 7, 13 belong to the genus *Trichoderma*; 109 to *Fusarium*; and 111 to *Aspergillus*.

La mayor eficacia de biocontrol de MS se dio a los seis días después de la inoculación con *P. digitatum* sobre frutos de mandarina, con valores comprendidos desde 15 % hasta 85 %. Sin embargo, a los nueve días de almacenamiento presentaron valores de 10 % a 80 % de eficacia de control. Los frutos tratados con fungicida presentaron la mayor eficacia de control (100 %), seguido de los MS de las cepas HE-ArT-109 y HE-ArR-1 con 80 y 55 %, respectivamente (Figura 5).

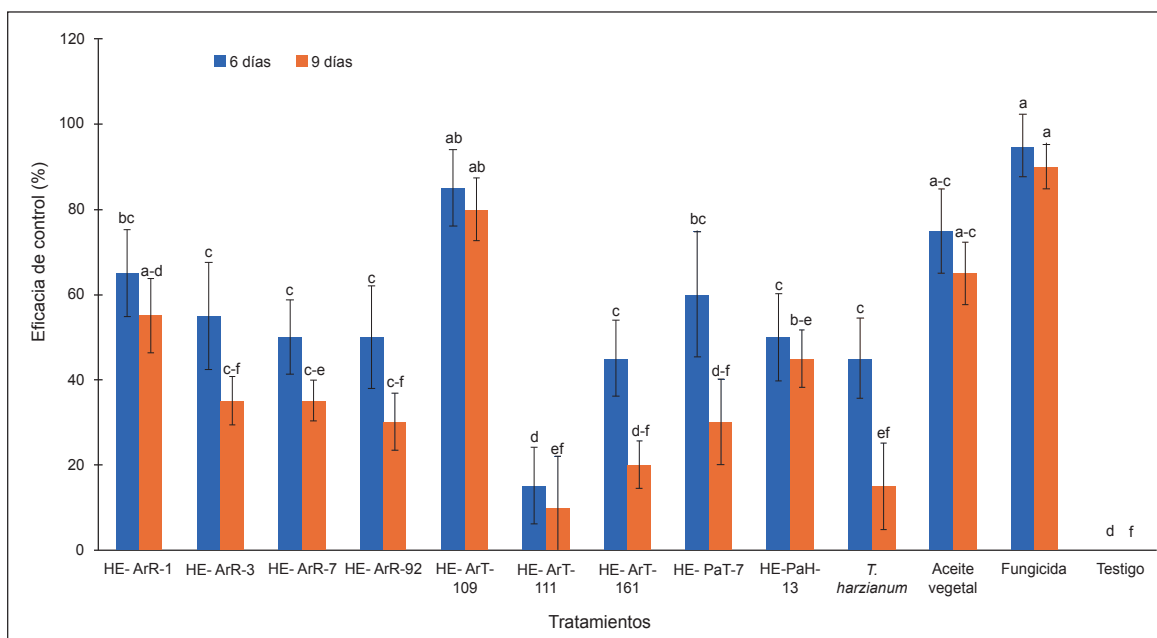


**Figura 4.** Efecto de metabolitos secundarios (MS) de hongos endófitos (HE) en el desarrollo de la enfermedad del moho verde (*Penicillium digitatum*) en frutos de mandarina (*Citrus reticulata*) a los 6 y 9 días de almacenamiento. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú. 2022.

Hongos endófitos (HE) aislados de tejidos de raíz (R), tallo (T) y hoja (H) de plantas de arándano (Ar) y papa (Pa). Cepas 1, 3, 7, 92, 161, 7, 13 pertenecen al género *Trichoderma*, 109 a *Fusarium*, y 111 a *Aspergillus*.

**Figure 4.** Effect of secondary metabolites (SM) from endophytic fungi (HE) on the development of green mold (*Penicillium digitatum*) disease in mandarin fruits (*Citrus reticulata*) after 6 and 9 days of storage. Plant Health Laboratory, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Peru. 2022.

Endophytic fungi (HE) isolated from root (R), stem (T), and leaf (H) tissues of blueberry (Ar) and potato (Pa) plants. Strains 1, 3, 7, 92, 161, 7, 13 belong to the genus *Trichoderma*; 109 to *Fusarium*; and 111 to *Aspergillus*.



**Figura 5.** Eficacia de biocontrol de metabolitos secundarios de cepas de hongos endófitos sobre el moho verde (*Penicillium digitatum*) en frutos de mandarina (*Citrus reticulata*) a los seis y nueve días después de la inoculación de *P. digitatum*. Laboratorio de Sanidad Vegetal, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Perú. 2022.

Hongos endófitos (HE) aislados de tejidos de raíz (R), tallo (T) y hoja (H) de plantas de arándano (Ar) y papa (Pa). Cepas 1, 3, 7, 92, 161, 7, 13 pertenecen al género *Trichoderma*, 109 a *Fusarium*, y 111 a *Aspergillus*.

**Figure 5.** Efficacy of biocontrol using secondary metabolites from endophytic fungal strains on green mold (*Penicillium digitatum*) in mandarin fruits (*Citrus reticulata*) at 6 and 9 days after *P. digitatum* inoculation. Plant Health Laboratory, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Peru. 2022.

Endophytic fungi (HE) isolated from root (R), stem (T), and leaf (H) tissues of blueberry (Ar) and potato (Pa) plants. Strains 1, 3, 7, 92, 161, 7, 13 belong to the genus *Trichoderma*; 109 to *Fusarium*; and 111 to *Aspergillus*.

## Discusión

Los hongos endófitos protegen a la planta huésped del ataque de patógenos a través de la antibiosis con la producción de metabolitos secundarios, el parasitismo y el mecanismo de competencia (Segaran & Sathivelu, 2019). En esta investigación, con la prueba de antibiosis, los metabolitos secundarios que liberaron las cepas endófitas de los géneros *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp., presentaron actividad antifúngica contra *P. digitatum*, con resultados similares a los tratamientos empleados como control (aceite vegetal y fungicida). Esta inhibición se debe a las múltiples sustancias antifúngicas presentes en los metabolitos extraídos, los cuales pueden actuar sobre o dentro de las células patógenas, y así inferir con el metabolismo de los patógenos (Zhang, Yin, et al., 2022).

Los frutos de mandarina tratados con los metabolitos secundarios mostraron menos síntomas de la enfermedad en comparación con el testigo, con una eficiencia de control del 80 % a los nueve días de almacenamiento. El control efectivo podría atribuirse a la actividad antifúngica que está asociada con la disrupción de la membrana celular, la

reducción de las actividades enzimáticas del patógeno y la acumulación de niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares en el cuerpo de *P. italicum*, lo que conlleva a la peroxidación de los lípidos de la membrana y a la apoptosis celular (Zhang, He, et al., 2022). También, el género *Fusarium* es un productor de metabolitos secundarios antimicrobianos y tiene actividades inhibitoras significativas contra hongos patógenos (Xu et al., 2023).

Estudios señalan que se aislaron e identificaron compuestos del hongo endófito *Fusarium* sp., que mostraron actividades herbicidas, antifúngicas y antibacterianas (Hussain et al., 2015). Es probable que en los metabolitos extraídos de la cepa 109 del género *Fusarium*, se encuentre el metabolito secundario *Fusaricide*, que también mostró actividad antifúngica contra *Penicillium chrysogenum* (McBrien et al., 1996). Lo cual indicaría la eficacia de control de *P. digitatum* con la aplicación de los MS de la cepa 109 del género *Fusarium* en los frutos de mandarina durante el almacenamiento. Estos metabolitos activos pueden prevenir el deterioro fúngico de cultivos, frutas y hortalizas, tanto en condiciones de campo como posteriores a la cosecha y podrían alargar la vida útil de productos alimenticios (Deshmukh et al., 2018). El control efectivo del moho verde en los frutos de los cítricos por los metabolitos, puede ser atribuido a los efectos antifúngicos sobre *P. digitatum*. Estos agentes efectivos para el control biológico pueden reducir de manera segura y efectiva la alta tasa de descomposición de los frutos de los cítricos causada por *Penicillium* spp. en almacenamiento poscosecha.

## Conclusiones

Los metabolitos secundarios de las cepas de hongos endófitos del género *Aspergillus* (HE-ArT-111) y *Fusarium* (HE-ArT-109), inhibieron el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum* en un 95,05 y 87,51 %, respectivamente. La cepa HE-ArT-109 redujo el desarrollo del moho verde en frutos de mandarina en un 80 %, a los nueve días de almacenamiento.

## Agradecimiento

Los autores reconocen el apoyo financiero a la Universidad Nacional de Cañete, a través del proyecto de investigación “Prospección de enfermedades fúngicas en cítricos en el valle de Cañete y su biocontrol *in vitro*” del semillero de investigación “Control biológico de enfermedades en plantas”.

## Referencias

- Agraria.pe. (2023, mayo 23). Hemos observado una fuerte demanda de cítricos peruanos, especialmente de mandarinas sin semillas. Agraria.pe Agencia Agraria de Noticias. <https://agraria.pe/noticias/hemos-observado-una-fuerte-demanda-de-citricos-peruanos-espe-31885>
- Almaraz Sanchez., A., Ayala Escobar, V., Tlatilpa Santamaría, I. F., & Nieto Angel, D. (2019). *Fusarium sambucinum* Fuckel agente causal de la pudrición de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens*) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1), 159–169. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1810-2>
- Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora, O., Salgado-Siclán, M. L., & Aquino-Martínez, J. G. (2017). Inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(2), 170–185. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-1>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (3<sup>rd</sup> ed.). Macmillan Publishing Company.

- Barron, G. L. (1968). *The genera of Hyphomycetes from soil*. Williams and Wilkins Co.
- Cocco, M., Vázquez, D. E., Albors, A., Cháfer, M., Meier, G. E., & Bello, F. (2008). Combinación de tratamientos térmicos y bicarbonato de sodio para el control de *Penicillium digitatum* en frutos cítricos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 9(1), 55–62.
- Costa, J. H., Wassano, C. I., Figueiredo Angolini, C. F., Scherlach, K., Hertweck, C., & Pacheco Fill, T. (2019). Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. *Scientific Reports*, 9(1), Article 18647. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55204-9>
- Deshmukh, S. K., Gupta, M. K., Prakash, V., & Saxena, S. (2018). Endophytic fungi: A source of potential antifungal compounds. *Journal of Fungi*, 4, Article 77. <https://doi.org/10.3390/jof4030077>
- 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.
- Gómez de Membrillera, J. G. (1950). Clave determinativa de las especies del género *Penicillium*. En: Universidad de Murcia (Ed.), *Anales de la Universidad de Murcia* (pp. 417–524). Universidad de Murcia. <http://hdl.handle.net/10201/6407>
- Gupta, S., & Saxena, S. (2023). Endophytes: Saviour of apples from post-harvest fungal pathogens. *Biological Control*, 182, Article 105234. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105234>
- Hussain, H., Drogies, K. -H., Al-Harrasi, A., Hassan, Z., Shah, A., Rana, U. A., Green, I. R., Draeger, S., Schulz, B., & Krohn, K. (2015). Antimicrobial constituents from endophytic fungus *Fusarium* sp. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(3), 186–189. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60650-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60650-2)
- Khare, E., Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Multifaceted interactions between endophytes and plant: Developments and prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9, Article 2732. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732>
- Leon Ttacca, B., Astete Farfán, A., Mattos Calderón, L. L., & Arévalo Gardini, E. (2022). Endophytic mycobiota associated to plants of *Vaccinium corymbosum* L. in Cañete valley- Perú. *Revista de La Facultad de Agronomía de La Universidad Del Zulia*, 39(1), Article 223922. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/37793>
- Leon-Ttacca, B., Yactayo-Yataco, R. J., Astete-Farfán, A., Mattos-Calderón, L. L., & Arestegui-Cantoral, J. C. (2022). Antibiosis y micoparasitismo de hongos endófitos sobre el agente causal del moho gris. *Bioagro*, 34(2), 209–220. <https://doi.org/10.51372/bioagro343.1>
- Li, Y., Xia, M., He, P., Yang, Q., Wu, Y., He, P., Ahmed, A., Li, X., Wang, Y., Munir, S., & He, Y. (2022). Developing *Penicillium digitatum* management strategies on post-harvest citrus fruits with metabolic components and colonization of *Bacillus subtilis* L1-21. *Journal of Fungi*, 8(1), Article 80. <https://doi.org/10.3390/jof8010080>
- McBrien, K. D., Gao, Q., Huang, S., Klohr, S. E., Wang, R. R., Pirmik, D. M., Neddermann, K. M., Bursuker, I., Kadow, K. F., & Leet, J. E. (1996). Fusaricide, a new cytotoxic N-Hydroxypyridone from *Fusarium* sp. *Journal of Natural Products*, 59(12), 1151–1153. <https://doi.org/10.1021/np960521t>
- Ministerio de Agricultura. (2023). *Cítricos: Perú un campo fértil para sus inversiones*. <https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/organizaciones/dgca/citricos.pdf>
- Nicoletti, R., & Fiorentino, A. (2015). Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of *Spermatophyta*. *Agriculture*, 5(4), 918–970. <https://doi.org/10.3390/agriculture5040918>

- Segaran, G., & Sathiavelu, M. (2019). Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, Article 101284. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101284>
- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., & Ait Ben Aoumar, A. (2014). Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/jam.12495>
- Wang, Z., Sui, Y., Li, J., Tian, X., & Wang, Q. (2022). Biological control of postharvest fungal decays in *Citrus*: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(4), 861–870. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1829542>
- Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F. R., Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Curk, F., Du, D., Ollitrault, P., Roose, M. L., Dopazo, J., Gmitter, F. G., Rokhsar, D. S., & Talon, M. (2018). *Genomics of the origin and evolution of Citrus*. *Nature*, 554, 311–316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>
- Xu, M., Huang, Z., Zhu, W., Liu, Y., Bai, X., & Zhang, H. (2023). Fusarium-derived secondary metabolites with antimicrobial effects. *Molecules*, 28(8), Article 3424. <https://doi.org/10.3390/molecules28083424>
- Zhang, J., He, L., Guo, C., Liu, Z., Kaliaperumal, K., Zhong, B., & Jiang, Y. (2022). Evaluation of *Aspergillus aculeatus* GC-09 for the biological control of citrus blue mold caused by *Penicillium italicum*. *Fungal Biology*, 126(3), 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.12.006>
- Zhang, R., Yin, J., Sui, Z., Han, L., Li, Y., & Huang, J. (2022). Biocontrol of antifungal volatiles produced by *Ceriporia lacerate* HG2011 against citrus fruit rot incited by *Penicillium* spp. *Postharvest Biology and Technology*, 194, Article 112094. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112094>