

Hongos endófitos en cucurbitáceas criollas de Yucatán, México

Endophytic fungi from creole cucurbits in Yucatan, Mexico

Diego Montañez-De Azcué, Jairo Cristóbal-Alejo

Tecnológico Nacional de México Campus Conkal. Avenida Tecnológico s/n, CP 97345, Conkal, Yucatán, México

RESUMEN

Antecedentes: Los hongos endófitos son microorganismos simbiotes de plantas, diversos y abundantes en regiones tropicales. Sin embargo, los estudios en cucurbitáceas se han limitado a regiones templadas y semiáridas.

Objetivo: Aislar hongos endófitos asociados a cucurbitáceas criollas de Yucatán.

Métodos: Se aislaron y purificaron en diferentes medios de cultivo, hongos endófitos de hojas, tallos, raíces, flores y semillas de pepino blanco (*Cucumis sativus*) y calabazo (*Lagenaria siceraria*).

Resultados y conclusiones: Se obtuvieron 319 aislamientos e identificaron 16 géneros, predominantemente *Aspergillus*. Se registró por primera vez la presencia de hongos endófitos en cucurbitáceas criollas tropicales. Se recomienda evaluar los efectos antagónicos y promotores de crecimiento de las cepas aisladas.

Palabras clave: *Cucumis sativus*, *Lagenaria siceraria*, medios de cultivo, regiones tropicales

ABSTRACT

Background: Endophytic fungi are symbiotic microorganisms of plants. They are diverse and abundant in tropical regions. However, studies on cucurbits have been limited to temperate and semi-arid regions.

Objective: To isolate endophytic fungi associated with creole cucurbits from Yucatan.

Methods: Endophytic fungi were isolated and purified, using different growth media, from leaves, stems, roots, flowers, and seeds of white cucumber (*Cucumis sativus*) and calabash (*Lagenaria siceraria*).

Results and conclusions: Three-hundred-nineteen isolates were obtained, and 16 genera were identified, predominantly *Aspergillus*. The presence of endophytic fungi in tropical creole cucurbits was recorded for the first time. Testing the antagonistic and growth-promoting effects of the isolated strains is recommended.

Keywords: *Cucumis sativus*, *Lagenaria siceraria*, growth media, tropical regions

ARTICLE HISTORY

Received: 10 January 2023

Accepted: 4 September 2024

On line: 23 October 2024

CORRESPONDING AUTHOR

✉ Jairo Cristóbal-Alejo, email: jairo.ca@conkal.tecnm.mx

Orcid: 0000-0001-9354-1129

En Yucatán crecen numerosos cultivares criollos de cucurbitáceas con relevancia económica, nutricional y cultural. El pepino blanco o pepino indio (*Cucumis sativus* L.) se caracteriza por sus frutos blancos, claviformes o piriformes, ampliamente comercializados y consumidos en el estado. El calabazo o calabacito (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.) produce frutos botuliformes, globosos o claviformes, empleados en la manufactura de utensilios de cocina, juguetes o instrumentos musicales (Lira Saade 2001).

Los hongos endófitos (HE) son organismos benéficos que se encuentran en los tejidos de las plantas, en los cuales pueden habitar durante parte de su ciclo de vida o de forma permanente (Bacon y White 2016). Su diversidad varía con el hospedero, la edad de la planta, el ecosistema, la ubicación geográfica y factores climáticos (Kim et al. 2013). En las zonas tropicales es donde suele existir mayor diversidad y abundancia, así como una aparente menor especificidad de hospederos (Gamboa-Gaitán 2006).

Al menos 90 géneros de HE se asocian con especies de cucurbitáceas, siendo frecuentes *Fusarium*, *Colletotrichum* y *Alternaria* (Huang et al. 2020). La mayoría de los aislamientos de HE de cucurbitáceas se han obtenido en regiones templadas (Mu et al. 2010, Xue et al. 2015, González et al. 2020, Tymon et al. 2020); seguido de regiones semi-áridas (Boughalleb-M'Hamdi et al. 2018). Por lo que las cucurbitáceas tropicales representan microhábitats inexplorados, reservorios de una diversidad fúngica desconocida. El objetivo del presente estudio fue aislar hongos endófitos de diferentes órganos de cultivares criollos de pepino blanco y calabazo cultivados en Yucatán.

Entre junio y julio de 2022, se tomaron muestras de hojas, tallos, raíces y flores de plantas de pepino blanco y calabazo, de tres meses de edad y sin síntomas aparentes de enfermedades, de un huerto familiar de Cauce, Yucatán (21°01'16.9" LN, 89°42'04.5" LO) y sin tratamiento fungicida. Para el aislamiento de HE de semillas, estas se adquirieron a través de productores de las localidades yucatecas de Kancabdzonot (20°30'33" LN, 88°42'38" LO), Muna (20°28'00" LN, 89°45'00" LO) y Sotuta (20°37'00" LN, 89°00'00" LO). Los órganos se colectaron y depositaron en bolsas plásticas resellables transparentes y estériles, para su transporte al Laboratorio de Fitopatología del Tecnológico Nacional de México (TecNM), Campus Conkal, Yucatán. Se procesaron ca. 2 h después de colectados.

Los órganos se lavaron previamente con agua corriente para eliminar residuos de tierra o sustrato, seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio comercial al 1.5% por 2 min, luego se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. Las siembras se hicieron en condiciones asépticas, colocando fragmentos de tejido vegetal de 1 cm² en cajas Petri estériles de 10 cm de diámetro, en cuatro medios de cultivo: Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Harina de Maíz-Agar (HMA), Jugo de 8 Vegetales-Agar (V8A) y Extracto de Cucurbitáceas-Agar (ECA). El V8A se preparó con jugo de vegetales V8 mixto marca Campbell's®. Para la preparación del ECA se hicieron modificaciones a la metodología propuesta para el cultivo de hongos fitopatógenos de trigo y cebada (Gilchrist-Saavedra et al. 2005), con hojas y tallos frescos de los cultivares muestreados.

Para las hojas, tallos, raíces y flores se hicieron cuatro réplicas por cada órgano de cada planta por cada medio de cultivo. En el caso de las semillas, fueron cuatro réplicas por localidad de procedencia y medio de cultivo. Los cultivos se sellaron e incubaron a 28 ± 2 °C y se conservaron durante 2 meses; se hicieron re-aislamientos cada vez que se observó crecimiento micelial hasta la obtención de cultivos puros. Para garantizar la efectividad de la metodología de purificación, se tomaron alícuotas del agua del último enjuague de algunas de las muestras, se vertieron en los medios de cultivo y se incubaron en las mismas condiciones que las siembras (en ninguno se registró crecimiento de microorganismos). Con la abundancia registrada para cada órgano y medio de cultivo, se realizaron análisis de varianza con comparaciones de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) mediante el software Minitab Statistical. Las cepas aisladas se conservaron en agua destilada, glicerol al 20 % y PDA con aceite mineral para su resguardo en el cepario del TecNM Campus Conkal.

Las cepas cultivadas que desarrollaron estructuras reproductivas y esporas se observaron en el microscopio para su caracterización a nivel de género. Muestras de micelio y esporas se colocaron en un portaobjetos con una gota de ácido láctico y se observaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Primo Star, Madrid, España). Las estructuras observadas se compararon con las reportadas en claves taxonómicas (Barnett y Hunter 1998).

El pepino blanco presentó 155 aislamientos. Las flores fueron las estructuras con mayor abundancia (62 aislamientos), seguidas de tallos (38), hojas (27), raíces (26) y semillas (2). En el calabazo, de los 164 aislamientos, la mayoría se obtuvieron de tallos (51), seguidos de raíces (43), hojas (26), flores (23) y semillas (21). Con excepción de las semillas de pepino, no hubo diferencia significativa en la abundancia registradas en el resto de los órganos (Tabla 1). El medio de cultivo que favoreció la mayor cantidad de crecimientos miceliales fue el ECA (92 aislamientos), seguido de PDA (88), HMA (80) y V8A (59). Aunque no hubo diferencia significativa ($P \leq 0.01$) en las abundancias entre medios de cultivo (Tabla 1), algunas cepas se mostraron selectivas hacia algunos de ellos (Tabla 2).

De la totalidad de aislamientos, 131 cepas se clasificaron en 16 géneros. *Aspergillus* fue el género con más registros, con 46 aislamientos en casi todos los órganos de ambas especies. *Lasiodiplodia* también se reportó en todos los órganos estudiados. Contrariamente, algunos géneros se observaron en una sola estructura vegetal (Tabla 2).

Las hojas de pepino verde suelen ser el órgano con mayores tasas de colonización por parte de los HE (Mu et al. 2010). Sin embargo, en pepino blanco y en calabazo criollo, los tallos, las raíces y las flores fueron igualmente importantes. Los HE en flores de cucurbitáceas solo tenían reportes en melón amargo (*Momordica charantia* L.), destacando en abundancia sobre los aislamientos de otras estructuras como las raíces (Huang et al. 2012). La efimeridad de las flores de estas especies podría ser un factor por el cual no

se contemplan en las bioprospecciones. Las semillas han demostrado poseer una eficiente tasa de colonización (Panaccione et al. 2014), aunque no había reportes para cucurbitáceas. La escasez de crecimientos encontrados en las semillas del cultivar criollo de pepino probablemente se deba a algún manejo fitosanitario aplicado a las plantas de procedencia.

El PDA es el medio de cultivo recurrente para el aislamiento de HE en cucurbitáceas (Mu et al. 2010, Xue et al. 2015, González et al. 2020, Tymon et al. 2020). El HMA también ha sido empleado, aunque con menor frecuencia, en estudios similares, al igual que medios preparados con harina de avena y extracto de malta. Estos medios de cultivo han demostrado buenos resultados en el aislamiento de endófitos para cucurbitáceas (Su et al. 2016, 2017, Su y Niu 2018). El PDA y el HMA se seleccionaron para este estudio a modo de complemento de aquellos medios de cultivo que no habían sido utilizados para el muestreo de endófitos en estas plantas. El V8A no se había probado en estudios bioprospectivos con cucurbitáceas, pero ha sido mayormente empleado para el aislamiento de microorganismos con requerimientos importantes de esteroides como *Phytophthora* spp. (Machado et al. 2013). El exceso de nutrientes, resultante de la combinación de los extractos vegetales que componen este medio, puede limitar el crecimiento de HE, cuyos requerimientos nutricionales son menores.

El uso de medio de cultivo preparado a partir de la misma especie vegetal de la cual se obtienen los aislamientos (ECA), resultó una estrategia eficiente. Esto tampoco se había probado para aislamientos de cu-

Tabla 1. Aislamiento de hongos endófitos en diferentes órganos vegetales y medios de cultivo

Órgano	Abundancia promedio en pepino	Abundancia promedio en calabazo	Medio de cultivo	Abundancia promedio en pepino	Abundancia promedio en calabazo
Tallo	9.50 ± 2.3 a	12.75 ± 2.0 a	ECA	7.0 ± 5.3 a	10.0 ± 4.5 a
Flor	10.75 ± 1.1 a	6.50 ± 3.1 a	PDA	6.5 ± 4.7 a	8.4 ± 5.7 a
Raíz	6.50 ± 2.9 a	10.75 ± 1.2 a	HMA	6.6 ± 4.7 a	9.4 ± 6.0 a
Hoja	9.00 ± 2.7 a	6.50 ± 2.6 a	AV8	5.6 ± 3.6 a	5.0 ± 2.4 a
Semilla	0.50 ± 1.0 b	5.25 ± 0.9 a			

Las medias dentro de la misma columna que no comparten letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Tabla 2. Géneros de hongos endófitos aislados de pepino y calabazo

Géneros aislados en pepino	Órgano de aislamiento*	Medio de cultivo
<i>Aspergillus</i>	F, T, R	PDA, ECA, V8A, HMA
<i>Chaetomium</i>	H, T	ECA, V8A, HMA
<i>Fusarium</i>	H, F, R	PDA, ECA, HMA
<i>Lasiodiplodia</i>	H, F, T, R, S	PDA, ECA, V8A, HMA
<i>Paecilomyces</i>	H	PDA, HMA
<i>Trichoderma</i>	T	PDA
Géneros aislados en calabazo	Órgano de aislamiento*	Medio de cultivo
<i>Aspergillus</i>	T, R, S	PDA, ECA, V8A, HMA
<i>Chaetomium</i>	H, T	ECA, V8A, HMA
<i>Colletotrichum</i>	F, T, R	PDA, ECA
<i>Cylindrocarpon</i>	R	ECA, HMA
<i>Diaporthe</i>	T	HMA
<i>Fusarium</i>	F, R	PDA, HMA
<i>Gymnascella</i>	H	ECA
<i>Lasiodiplodia</i>	H, F, T, R, S	ECA, V8A, HMA
<i>Microascus</i>	S	V8A, HMA
<i>Monosporascus</i>	R	ECA
<i>Myrothecium</i>	T, R	ECA
<i>Penicillium</i>	H	ECA
<i>Scolecobasidium</i>	H	V8A, ECA
<i>Trichoderma</i>	F	HMA
<i>Xylaria</i>	H	ECA

*H: hoja, F: flor, T: tallo, R: raíz, S: semilla

curbitáceas, pero sí para HE relacionados con tabaco, obteniendo resultados similares (González-Peña *et al.* 2014). A pesar de las abundancias similares reportadas para los medios de cultivo utilizados, es importante destacar que algunas cepas tienen preferencias por algún medio de cultivo. Por ejemplo, *Gymnascella* y *Monosporascus* solo crecieron en ECA, *Diaporthe* en HMA y ninguna cepa de hoja de calabazo creció en PDA.

Considerar las diferentes estructuras de la planta es parte fundamental de la metodología para aislar sus HE y considerar la mayor diversidad de especies cultivables, principalmente en regiones tropicales donde existe mayor especialización en cuanto a tejidos vegetales colonizados (Gamboa-Gaitán 2006). Así mismo, es recomendable el uso de diferentes medios de cultivo para obtener diversidad confiable, así como para determinar cuáles pueden favorecer mayor velocidad de crecimiento y esporulación. Con la finalidad de optimizar el tiempo dedicado a este tipo de estudios, disminuir la presencia de contaminantes y ahorrar insumos, conviene optar por medios de cultivo selectivos con bajo contenido nutricional (Cotilla *et al.* 2007).

Los géneros aislados en este trabajo se han reportado como especies endófitas con una gran utilidad biotecnológica para el control de patógenos en condiciones de laboratorio y campo, destacando cepas de *Aspergillus* (Rashad *et al.* 2022), *Lasioidiplodia* (Segaran y Sathivelu 2023), *Penicillium* (Toghueo y Boyom 2020) y *Trichoderma* (Khan y Javaid 2020, Khan *et al.*, 2020). Es conveniente explorar los efectos antagónicos y antibióticos de las cepas aisladas frente a los fitopatógenos locales, así como sus efectos promotores de crecimiento en cultivos de cucurbitáceas o de otras especies vegetales de importancia comercial.

AGRADECIMIENTOS

Tecnológico Nacional de México: Proyecto "Efecto antifúngico de hongos endófitos de *Cucumis sativus* y *Lagenaria siceraria*, cultivares criollos de Yucatán (TecNM 17601.23-P)", al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de posgrado otorgada y al equipo de colaboradores del Laboratorio de Fitopatología del TecNM Campus Conkal.

LITERATURA CITADA

- Bacon CW, White JF. 2016. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. *Symbiosis* 68, 87-98. <http://doi.org/10.1007/s13199-015-0350-2>
- Barnett HL, Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. APS Press, St. Paul.
- Boughalleb-M'Hamdi NI, Salem B, M'Hamdi M. 2018. Evaluation of the efficiency of *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus* species as biological control agents against four soil-borne fungi of melon and watermelon. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28, 25. <http://doi.org/10.1186/s41938-017-0010-3>
- Cotilla L, Díaz A, Berroa G, Rodríguez R. 2007. Influencia de cuatro medios de cultivo sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora palmívora* (Butler) Butl. *Centro Agrícola* 34, 49-52.
- Gamboa-Gaitán MA. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana* 11, 3-20. www.scielo.org.co/pdf/abc/v11s1/v11s1a01.pdf
- Gilchrist-Saavedra L, Fuentes-Dávila G, Martínez-Cano C, López-Atilano RM, Duveiller E, Singh RP, Henry M, García I. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. CIMMYT. 2ª. edición, México, D.F.
- González V, Armijos E, Garcés-Claver, A. 2020. Fungal endophytes as biocontrol agents against the main soil-borne diseases of melon and watermelon in Spain. *Agronomy* 10, 820. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060820>
- González-Peña D, Costales Menéndez D, Falcón-Rodríguez AB. 2014. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. *Revista de Protección Vegetal* 29, 33-41.
- Huang JH, Xiang MM, Jiang ZD. 2012. Endophytic fungi of bitter melon (*Momordica charantia*) in Guangdong Province, China. *The Great Lakes Entomologist* 45, 19-28. <http://doi.org/10.4236/as.2015.66060>
- Huang LQ, Niu YC, Su L, Deng H, Lyu H. 2020. The potential of endophytic fungi isolated from cucurbit plants for biocontrol of soilborne fungal diseases of cucumber. *Microbiological Research* 23. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126369>
- Khan RAA, Najeeb S, Hussain S. 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. *Microorganisms* 8(6), 817. <http://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>
- Khan IH, Javaid A. 2020. *In vitro* biocontrol potential of *Trichoderma pseudokoningii* against *Macrophomina phaseolina*. *International Journal of Agriculture and Biology* 24(4), 730-736. <http://doi.org/10.17957/IJAB/15.1494>
- Kim CK, Eo JK, Eom AH. 2013. Diversity and seasonal variation of endophytic fungi isolated from three conifers in Mt. Taehwa, Korea. *Mycobiology* 41, 82-85. <http://doi.org/10.5941/myco.2013.41.2.82>

- Lira Saade R. 2001. Familia Cucurbitaceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes 92. Instituto de Ecología A.C., Pátzcuaro. <http://doi.org/10.21829/fb.301.2001.92>
- Machado M, Peña-Marey M, Álvarez A, Díaz A, Zamora V, Coto O. 2013. Variabilidad intraespecífica de cepas de *Phytophthora palmivora* Butler (Butler) aisladas de plantaciones de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. Revista de Protección Vegetal 28, 178-184.
- Mu L, Niu Y, Deng H. 2010. The endophytic mycobiota in summer growing cucumber in Beijing. Mycosystema 29, 214-221. <http://doi.org/10.13346/j.mycosystema.2010.02.021>
- Panaccione DG, Beaulieu WT, Cook D. 2014. Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. Functional Ecology 28, 299-314. <http://doi.org/10.1111/1365-2435.12076>
- Rashad YM, Abdalla SA, Shehata AS. 2022. *Aspergillus flavus* YRB2 from *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl., a non-aflatoxigenic endophyte with ability to overexpress defense-related genes against *Fusarium* root rot of maize. BMC Microbiology 22, 229. <http://doi.org/10.1186/s12866-022-02651-6>
- Segaran G, Sathiavelu M. 2023. Fungicidal and plant growth promoting traits of *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, an endophyte from *Andrographis paniculata*. Frontiers in Plant Science 14, 1125630. <http://doi.org/10.3389/fpls.2023.1125630>
- Su L, Niu Y. 2018. Multilocus phylogenetic analysis of *Talaromyces* species isolated from cucurbit plants in China and description of two new species, *T. cucurbitiradicus* and *T. endophyticus*. Mycologia 110, 375-386. <http://doi.org/10.1080/00275514.2018.1432221>
- Su L, Deng H, Niu Y. 2016. *Phialemoniopsis endophytica* sp. nov., a new species of endophytic fungi from *Luffa cylindrica* in Henan, China. Mycological Progress 15, 48-54. <http://doi.org/10.1007/s11557-016-1189-5>
- Su L, Deng H, Niu Y. 2017. Phylogenetic analysis of *Plectosphaerella* species based on multi-locus DNA sequences and description of *P. sinensis* sp. nov. Mycological Progress 16, 823-829. <http://doi.org/10.1007/s11557-017-1319-8>
- Toghueo RMK, Boyom FF. 2020. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. 3 Biotech 10, 107. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2081-1>
- Tymon LS, Morgan P, Gundersen B, Inglis DA. 2020. Potential of endophytic fungi collected from *Cucurbita pepo* roots grown under three different agricultural mulches as antagonistic endophytes to *Verticillium dahliae* in western Washington. Microbiological Research 240, 126535. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126535>
- Xue Q, Niu Y, Deng H. 2015. Diversity of endophytic fungi in common cucurbit plants. Mycosystema 34, 196-203. <http://doi.org/10.13346/j.mycosystema.140030>