

## Identificación de hongos endófitos de *Ageratina pichinchensis* con actividad antagonica contra fitopatógenos de importancia agrícola

Valeria Camacho-Luna<sup>1</sup>  
Aida Aracelí Rodríguez-Hernández<sup>2</sup>  
Mario Rodríguez-Monroy<sup>1</sup>  
Robledo Norma<sup>3</sup>  
Gabriela Sepúlveda-Jiménez<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional. Calle CEPROBI núm. 8, colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, México. CP. 62731. (vcamachol1100@alumno.ipn.mx; mrmonroy@ipn.mx). <sup>2</sup>CONACYT-Instituto Politécnico Nacional-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Calle CEPROBI núm. 8, colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, México. CP. 62731. (arodriguezhe@ipn.mx). <sup>3</sup>Departamento de Interacciones Planta-Insecto-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional. Calle CEPROBI núm. 8, colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, México. CP. 62731. (nrobledo@ipn.mx).

§Autora para correspondencia: gsepulvedaj@ipn.mx.

### Resumen

*Ageratina pichinchensis* es una planta medicinal, endémica de México conocida como Axihuitl. Los extractos de las hojas muestran actividad antifúngica contra hongos dermatofitos, pero no hay estudios de la identificación de los hongos endófitos. El objetivo fue identificar hongos endófitos de *A. pichinchensis* con potencial como agentes de control biológico de fitopatógenos. De las hojas de *A. pichinchensis* se aislaron 55 morfoespecies de hongos endófitos que pertenecen al filo Ascomycota. La identificación molecular basada en el análisis de las secuencias de los espaciadores internos transcritos (ITS) amplificadas por PCR mostró que seis de los hongos más frecuentes corresponden a *Remotididymella anthropophila* y *Diaporthe caatingaensis* y a los géneros *Diaporthe*, *Phomopsis* y *Fusarium*. En ensayos de antagonismo múltiple, siete morfoespecies mostraron actividad antagonica fuerte contra los patógenos *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* y *Stemphylium vesicarium* dos hongos endófitos pertenecen a *Alternaria alternata*, otro a *Trichoderma longibrachiatum* y otros dos son de los géneros *Alternaria* y *Phomopsis*. Mientras que *Nigrospora oryzae* fue el único endófito más frecuente y con actividad antagonica contra los tres patógenos. En ensayos de cultivo dual, los endófitos con actividad antagonica fuerte inhibieron de 37 al 80% el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. proliferatum*, pero en el ensayo de alimento envenenado, *T. longibrachiatum* inhibió el crecimiento micelial de los dos patógenos en 79 y 66%, respectivamente. Por primera vez se reporta a *R. anthropophila* como un hongo endófito, así como la identificación y la actividad antagonica de hongos endófitos de *A. pichinchensis*.

**Palabras clave:** *Fusarium*, *Nigrospora*, *Remotididymella*, *Trichoderma*, biocontrol.

Recibido: abril de 2022

Aceptado: junio de 2022

## Introducción

Los microorganismos endófitos son aquellos que colonizan los tejidos de las plantas, pero sin causar síntomas visibles de enfermedad (Hardoim *et al.*, 2015). En extractos de plantas medicinales, la actividad antimicrobiana se relaciona con la proporción de endófitos, (Egamberdieva *et al.*, 2017). Por lo que, los hongos endófitos de las plantas medicinales podrían usarse como agentes de biocontrol de fitopatógenos.

La planta medicinal *Ageratina pichinchensis* (Kunth) R.M. King & H. Rob (anteriormente llamada *Eupatorium aschembornianum* S. Schauer) es endémica de México y es una hierba perenne silvestre que crece en las áreas boscosas en 28 de los 32 estados mexicanos (Rzedowski y Rzedowski, 2001). En el estado de Morelos, se le conoce como Axihuitl y crece en el área natural protegida del Corredor Biológico Chichinautzin. Es una planta que se utiliza en la medicina tradicional para tratar úlceras gástricas, infecciones cutáneas, heridas y tumores (Avilés y Suárez, 1994). Los extractos de las hojas tienen actividad antifúngica contra los hongos dermatofitos *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Ríos *et al.*, 2003). Sin embargo, los estudios de la identificación de los hongos endófitos de *A. pichinchensis* con actividad antagonica contra fitopatógenos son escasos.

Los hongos del género *Fusarium* y *Stemphylium* causan enfermedades en diversos cultivos. *Fusarium oxysporum* causa la marchitez vascular o pudrición de la raíz en cultivos como alfalfa, frijol, algodón, lechuga, cebolla, chícharos, pimiento, papa, soja, espinaca, y tomate (Munkvold, 2017). *F. proliferatum* es un componente del complejo de la pudrición de la mazorca y del tallo en el maíz, en espárragos, bananos, palmeras datileras, higos, mangos, pinos, sorgo y cebollas (Munkvold, 2003). *Stemphylium vesicarium* es el agente causal de la enfermedad tizón foliar en cebolla y ajo (Rao y Pavgi, 1975; Zapata-Sarmiento *et al.*, 2020) y también afecta los espárragos, haba y arroz (Sheikh *et al.*, 2015; Graf *et al.*, 2016; Foster *et al.*, 2019). Por lo cual, el objetivo de este estudio fue la identificación de hongos endófitos de *A. pichinchensis* con potencial para el control biológico de fitopatógenos del género *Fusarium* y *Stemphylium*.

## Materiales y métodos

### Colecta de material vegetal

Las plantas de *Ageratina pichinchensis* se colectaron en octubre de 2019 en el Corredor Biológico Chichinautzin, Morelos, México, coordenadas geográficas 18° 59' 26.4" latitud norte 99°17'09.2" longitud oeste. Un ejemplar se depositó en el herbario HUMO de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (Voucher 3571) y las plantas se identificaron por personal capacitado de la misma institución. Las plantas tenían 1 m de altura y estaban en etapa de floración. En total se colectaron 40 hojas sin síntomas de enfermedad de 20 plantas, dos hojas por cada planta.

### Aislamiento de hongos endófitos y su clasificación en morfoespecies

Los hongos endófitos se aislaron y clasificaron en morfoespecies de acuerdo con Arnold *et al.* (2001). De las hojas se cortaron cinco fragmentos de 5 mm<sup>2</sup> y la superficie de los fragmentos se desinfectó con etanol (70%) por 2 min, con hipoclorito de sodio (0.52%) por 2 min y dos lavados con agua destilada estéril.

Para evaluar la eficacia de la desinfección, de cada fragmento se obtuvo una impresión en medio de cultivo de papa, dextrosa y agar (PDA, Bioxon) en cajas Petri, que se incubaron por ocho días. La ausencia de crecimiento micelial indicó que el método de desinfección fue efectivo para eliminar los hongos epifitos. Al mismo tiempo, los cinco fragmentos se secaron y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo de PDA. Las cajas Petri se incubaron a  $27 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad hasta observar el crecimiento de las hifas. Las puntas de las hifas se subcultivaron para obtener colonias puras en cajas Petri con PDA.

Los hongos se clasificaron en morfoespecies de acuerdo con las siguientes características morfológicas: producción de esporas, micelio aéreo, color de la colonia, color del medio de cultivo, textura de la superficie y características del borde. La frecuencia relativa (FR) de cada morfoespecie se calculó con Photita *et al.* (2001) y la fórmula:  $FR = \left( \frac{\text{Número de fragmentos colonizados por el hongo}}{\text{Total de fragmentos}} \right) \times 100$ .

### Ensayo de antagonismo múltiple

Previamente, los aislados de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* se obtuvieron de bulbos de cebolla y el aislado de *S. vesicarium* se obtuvo de hojas de cebolla. Previo a realizar los ensayos, los hongos patógenos como los endófitos se cultivaron en medio de PDA (Bioxon), a  $27 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 12 h luz:12 h oscuridad por siete días.

La actividad antagonica de cada morfoespecie contra los tres fitopatógenos se evaluó en un ensayo de antagonismo múltiple descrito por Sánchez-Fernández *et al.* (2015). Para cada endófito en confrontación múltiple y los controles se hicieron tres repeticiones. Los resultados se analizaron por triplicado mediante el análisis de conglomerados con el paquete ‘fastcluster’ de la versión 3.4.2 de Rstudio. La actividad antagonica se clasificó de acuerdo con la escala modificada de Yuen *et al.* (1999) como: a) fuerte, el hongo endófito inhibe el crecimiento de los patógenos y crece hasta el patógeno y lo rodea; b) débil, el hongo endófito y el patógeno crecen y sus hifas se entremezclan y no reducen su crecimiento; c) mutuo, el hongo endófito y el patógeno crecen hasta el contacto y dejan de crecer; y d) nulo, el patógeno crece hasta el endófito, lo rodea e inhibe su crecimiento.

### Identificación molecular de los hongos endófitos con la mayor actividad antagonica

Los hongos endófitos que se encontraron con una FR mayor al 5% y que en el ensayo de antagonismo múltiple mostraron una actividad antagonica fuerte se cultivaron en medio PDA (Difco) por siete días. El micelio se colectó, se congeló y pulverizó en un mortero con N<sub>2</sub> líquido. Para la purificación de ADN se empleó el Dneasy Plant Mini Kit (Quiagen, Germany). Las regiones ITS de los hongos se amplificaron utilizando los primers ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' CTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGC 3') diseñados por White *et al.* (1990). Las condiciones de amplificación fueron las reportadas por Zapata-Sarmiento *et al.* (2020).

La secuenciación se realizó por la empresa MacroGen Inc Services (Seoul, Corea). La secuencia consenso se obtuvo con el software BioEdit Program (versión 7.0.5) y las secuencias se depositaron en el GenBank con el programa Blast de la base de datos del National Center for Biotechnology Information. En base a los resultados del análisis de Blast, para asignar un nombre a una especie se consideró una identidad  $\geq 98$  a 100% y una cobertura  $\geq 80\%$  con otras secuencias. A las secuencias que no cumplían con dichos criterios se asignó el nombre a nivel de género.

## Ensayo de cultivo dual

Los hongos endófitos con actividad antagónica fuerte se seleccionaron para evaluar su actividad antagónica en ensayos de cultivo dual contra *F. oxysporum* y *F. proliferatum* de acuerdo a Zapata-Sarmiento *et al.* (2020). Para cada hongo endófito en cultivo dual con cada patógeno y los controles se realizaron seis repeticiones. Cada 24 h se tomaron fotografías de los cultivos y las imágenes se analizaron utilizando el programa ImageJ (versión 1.8) para calcular el área (cm<sup>2</sup>) de crecimiento micelial del patógeno.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) se calculó mediante la ecuación:  $ICM = (C - T) \times 100 \div C$ . Donde: C= corresponde al área del crecimiento micelial del patógeno en el control; y T= área del crecimiento micelial en el cultivo dual.

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (Anova) y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey en Rstudio (versión 1.2.1335) con la librería Agricolae. El tipo de interacción entre el hongo endófito y el fitopatógeno se registró después de 15 días de incubación. De acuerdo con Bertrand *et al.* (2013), las interacciones se clasificaron en: inhibición a distancia, zona de líneas, inhibición al contacto y sobrecrecimiento.

## Ensayo de actividad antagónica de los metabolitos no volátiles

La actividad antagónica de los filtrados libres de células de los hongos endófitos *Trichoderma longibrachiatum*-EA54 y *Nigrospora oryzae*-EA51 contra *F. oxysporum* y *F. proliferatum* se evaluó mediante la técnica de cultivo envenenado con Schmitz (1930). *T. longibrachiatum* y *N. oryzae* se cultivaron en cajas de Petri con medio de PDA (Difco TM) por siete días. Con el cultivo de *T. longibrachiatum* se preparó una suspensión de esporas a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas ml<sup>-1</sup>. En matraces Erlenmeyer (250 ml) con 50 ml de caldo papa dextrosa (CPD, Difco TM) se añadió 1.5 ml de la suspensión de esporas. Debido que *N. oryzae* en medio de cultivo de PDA carece de estructuras reproductivas, los matraces se inocularon con cinco bloques de medio de cultivo con micelio de 0.5 cm de diámetro. De cada hongo se prepararon tres matraces Erlenmeyer.

Los cultivos líquidos se incubaron en un agitador a 150 rpm y a  $27 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad. Después de cuatro días, se colectó el caldo de cultivo y se centrifugó a 4 500 rpm por 10 min; el sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.45 µm y luego de 0.22 µm (GVWP, Millipore) para obtener el filtrado libre de células que se usó para preparar el medio de cultivo de acuerdo con Zapata-Sarmiento *et al.* (2020). Para cada patógeno con cada filtrado libre de células y los respectivos controles se prepararon seis cajas Petri. Cada 24 h se tomaron fotografías y las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (versión 1.8) para calcular el área (cm<sup>2</sup>) de crecimiento micelial del patógeno. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) se calculó con la ecuación:  $ICM = (C - T) \times 100 \div C$ .

## Resultados y discusión

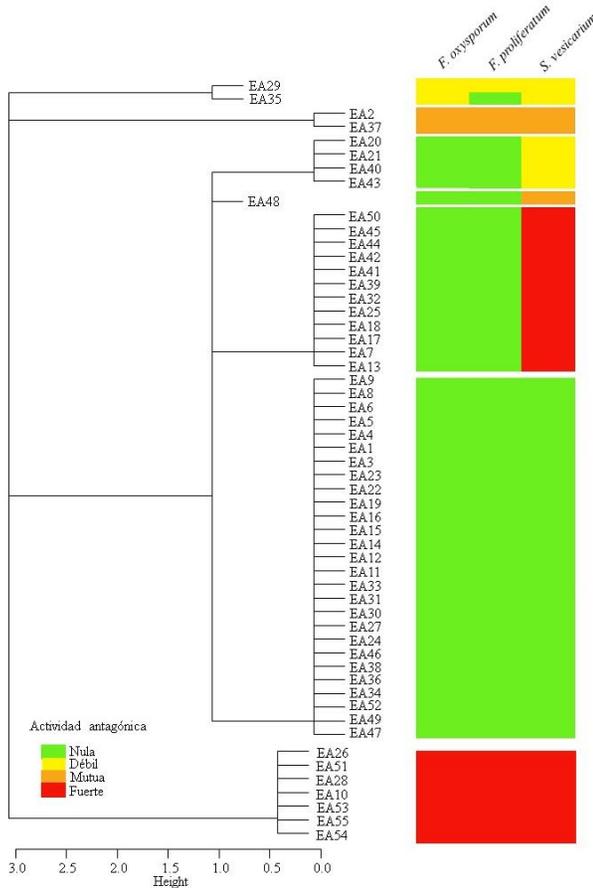
### Clasificación y frecuencia de las morfoespecies de los hongos endófitos

A partir de las hojas de *A. pichinchensis*, se obtuvieron 100 aislados de hongos endófitos. Con base en las características morfológicas, los aislados se clasificaron en 55 morfoespecies. El aislado EA38 fue la morfoespecie más frecuente con una frecuencia relativa (FR) de 20%; seguido de los

aislados EA37, EA39 y EA40 con una FR de 15% y luego los aislados EA30, EA42 y EA51 con una FR de 10%. Los aislados restantes presentaron una FR de 5%. La morfoespecie es un término taxonómico funcional útil para clasificar a los hongos endófitos, que son muy diversos en plantas que crecen en ambientes tropicales. Esta clasificación también es útil para identificar endófitos que carecen de estructuras reproductivas cuando se cultivan *in vitro* (Fröhlich y Hyde, 1999; Arnold *et al.*, 2001). Por esto se decidió utilizar esta clasificación para hongos endófitos de *A. pichinchensis*.

### Actividad antagónica de las morfoespecies de hongos endófitos en bioensayos de antagonismo múltiple

El análisis de conglomerados agrupó a las 55 morfoespecies de hongos endófitos de acuerdo con su actividad antagónica contra *S. vesicarium*, *F. proliferatum* y *F. oxysporum*. Siete morfoespecies (EA26, EA51, EA28, EA10, EA53, EA55 y EA54) mostraron actividad antagónica fuerte contra los tres patógenos. Mientras que, el crecimiento micelial de *S. vesicarium* fue fuertemente inhibido por 12 hongos endófitos y débilmente inhibido por seis. La inhibición mutua del crecimiento micelial con los tres patógenos se observó con los aislados EA2 y EA37, pero el aislado EA48 fue el único que mostró una inhibición mutua con *S. vesicarium* (Figura 1).



**Figura 1.** Análisis de conglomerados de la actividad antagónica (fuerte, mutua, débil o nula) de los hongos endófitos de *Ageratina pichinchensis* contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum* y *Stemphylium vesicarium*.

En la Figura 2 se muestra las interacciones que se observaron entre las siete morfoespecies de hongos endófitos clasificados con fuerte actividad antagonista contra los patógenos. Las morfoespecies de los aislados EA10, EA28 y EA54 crecieron sobre el micelio de los patógenos. Mientras que EA26, EA51, EA53 crecieron alrededor de los patógenos y la morfoespecie EA55 creció sobre *S. vesicarium* y sólo creció alrededor de las dos especies de *Fusarium*.



**Figura 2. Interacciones observadas en el ensayo de antagonismo múltiple de las siete morfoespecies de los hongos endófitos de *Ageratina pichinchensis* clasificados con fuerte actividad antagonista frente a los patógenos: a) *Fusarium oxysporum*; b) *Fusarium proliferatum*; y c) *Stemphylium vesicarium*.**

De las 55 morfoespecies de los hongos endófitos que se aislaron de *A. pichinchensis*, 12 de ellas mostraron actividad antagonista contra un patógeno y siete contra los tres patógenos. En forma similar se reportan el aislamiento de morfoespecies de hongos endófitos de plantas medicinales con actividad antagonista contra hongos patógenos. En *Etilingera elatior* (jengibre) se reporta el aislamiento de seis morfoespecies de hongos endófitos con actividad antagonista contra *Fusarium oxysporum*, *Ganoderma boninense* y *Rigidoporus lignosus* (Lutfia *et al.*, 2020) y en *Aloe dhufarensisi* se aislaron dos morfoespecies de hongos endófitos con actividad antagonista contra *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp (Al-Rashdi *et al.*, 2020).

En base a los resultados del ensayo de antagonismo múltiple, se seleccionaron las siete morfoespecies de hongos endófitos con actividad antagonista fuerte para su identificación a nivel molecular y para realizar los ensayos de actividad antagonista en cultivo dual y de alimento envenenado.

## Identificación de los hongos endófitos con actividad antagonista fuerte contra patógenos

En el Cuadro 1 se muestra la identificación a nivel molecular de los 12 aislados de hongos endófitos que se encontraron con una FR mayor al 5% y que además presentaron una actividad antagonista fuerte. Las secuencias de los aislados EA30 y EA40 cumplieron con el criterio de identidad ( $\geq 98\%$ ) y cobertura ( $> 80\%$ ) que corresponden a secuencias de *Remotididymella anthropophila* y *Diaporthe caatingaensis*, respectivamente. La secuencia del aislado EA37 también cumplió con el criterio de identidad y cobertura, pero es con una secuencia del banco de genes de una especie no identificada del género *Phomopsis*. Para los aislados EA38 y EA39 el valor de identidad fue menor al 98%, por lo cual se ubicaron en el género *Diaporthe*.

**Cuadro 1. Identificación molecular de los hongos endófitos de *Ageratina pichinchensis* con una frecuencia relativa (FR) mayor al 5% y que presentaron fuerte actividad antagonista contra los patógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum* y *Stemphyllum vesicarium*.**

Morfoespecie	Especie	Núm. de acceso	Identidad (%)	Cobertura (%)	
Con FR mayor a 5%	EA30	<i>Remotididymella anthropophila</i>	MT150607	99.1	99
	EA37	<i>Phomopsis</i> sp.	MT150610	99	100
	EA38	<i>Diaporthe</i> sp.	MT150611	97.8	91
	EA39	<i>Diaporthe</i> sp.	MT150612	97.1	100
	EA40	<i>Diaporthe caatingaensis</i>	MT150613	98.7	98
	EA42	<i>Fusarium</i> sp.	MT362619	92.2	96
Con FR mayor a 5%, antagonistas	EA51	<i>Nigrospora oryzae</i>	MT150620	99.8	97
	EA10	<i>Alternaria alternata</i>	MT107053	99.4	100
	EA26	<i>Alternaria</i> sp.	MT107054	99.8	100
	EA28	<i>Alternaria alternata</i>	MT150606	99.5	100
	EA54	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MT150622	99	96
	EA55	<i>Phomopsis</i> sp.	MT150623	99.5	99

Para el caso del aislado EA42, la identidad fue de 92.2% y por lo tanto, también sólo se ubicó en el género *Fusarium*. El aislado EA51 con una FR mayor al 5% y con actividad antagonista contra todos los patógenos mostró una identidad 99.8% con secuencias de *Nigrospora oryzae*. Los aislados de los hongos EA10 y EA28 con actividad antagonista mostraron una identidad mayor al 99% con secuencias de especies de *Alternaria alternata*. La secuencia del aislado EA26 mostró una identidad 99.8% con una especie no identificada del género *Alternaria* y las secuencias de los aislados EA54 y EA55 presentaron una identidad del 99 y 99.5% con secuencias de *Trichoderma longibrachiatum* y *Phomopsis* sp., respectivamente. Finalmente, el aislado EA53 fue el único que no se identificó a nivel molecular, pero en medio PDA no desarrolló estructuras reproductivas, presentó micelio aéreo, la colonia mostró una textura polvorosa, con margen irregular, con anillos y de color blanco.

Los hongos endófitos pertenecen a los órdenes Pleosporales, Trichophariales, Diapothales e Hypocreales. De acuerdo con la identificación molecular y los datos de la frecuencia relativa, el género *Phomopsis* (anamorfo de *Diaporthe*) fue el más frecuente seguido de *Fusarium* sp., *N. oryzae* y *R. anthropophila*. Algunas de las especies de hongos endófitos que se identificaron en *A. pichinchensis* también se reportan en otras especies de plantas del género *Ageratina*. Los hongos endófitos más abundantes en *A. adenophora* pertenecen al género *Phomopsis* (Mei *et al.*, 2014), mientras que *P. magnolia* y *N. oryzae* también se reportan como endófitos de *A. altissima* (Christian *et al.*, 2016). Los hongos del género *Phomopsis* son los endófitos que con más frecuencia se aíslan en especies de plantas tropicales (Murali *et al.*, 2006).

El hongo *N. oryzae* es un endófito con una distribución cosmopolita y una amplia gama de hospederos (Wang *et al.*, 2017). El hongo *R. anthropophila* no se ha reportado como endófito en otras plantas; pero, este hongo pertenece a la familia Didymellaceae, que incluye otras especies de hongos reportados como endófitos y fitopatógenos (Wang *et al.*, 2017). Similar a nuestros resultados, los hongos del género *Alternaria* y *Diaporthe* se reportan como endófitos de la planta medicinal *Ocimum sanctum* Linn. y también muestran actividad antagónica contra *F. oxysporum* (Chowdhary y Kaushik, 2015). Sin embargo, no hay reportes de la actividad antagónica de *Alternaria* sp. y *Phomopsis* sp. contra *F. proliferatum* y *S. vesicarium*. Con respecto a *N. oryzae*, se reporta que es un endófito de *Gossypium arboreum* (algodón) con actividad antagónica contra *F. solani* (Hiremani *et al.*, 2020), pero no hay reportes de la actividad antagónica de *Nigrospora* contra otras especies de *Fusarium* y *S. vesicarium*.

### Actividad antagónica de hongos endófitos en ensayos de cultivo dual

En cultivo dual, los siete aislados de hongos endófitos seleccionados inhibieron el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* de 37 al 80%. Los aislados de *T. longibrachiatum* y *N. oryzae* mostraron la mayor actividad antagónica, ya que en más 79% inhibieron el crecimiento de las dos especies de *Fusarium* (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Actividad antagónica de los hongos endófitos de *Ageratina pichinchensis* contra *Fusarium oxysporum* y *Fusarium proliferatum* en ensayos de cultivo dual.**

	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Fusarium proliferatum</i>	
	ICM (%)	CM (cm <sup>2</sup> )	ICM (%)	CM (cm <sup>2</sup> )
Control	0	51 ±1.4 a	0	58.8 ±3 a
<i>T. longibrachiatum</i> EA54	80	9.8 ±1.4 e	80	11.2 ±1.8 e
<i>Nigrosora oryzae</i> EA51	79	10.6 ± 1 e	83	9.7 ±1.5 e
EA53	56	22.1 ±1.1 d	53	27.7 ±1.2 d
<i>Phomopsis</i> sp. EA55	48	26.2 ±1.5 c	49	30.1 ±0.4 cd
<i>A. alternata</i> EA10	46	27.3 ±2.5 c	44	32.9 ±1.7 bc
<i>A. altarnata</i> EA28	42	29.4 ±2.2 bc	40	35.3 ±2.1 b
<i>Alternaria</i> sp. EA26	37	31.9 ±3 b	42	34.3 ±1.2 bc

Cada valor corresponde a la media ± desviación estándar (n= 5). Valores en la misma columna seguidos por diferentes letras difieren significativamente de acuerdo con la prueba HSD de Tukey ( $p < 0.05$ ). ICM= inhibición del crecimiento micelial; CM= crecimiento micelial.

En relación con *T. longibrachiatum*, se reporta que inhibe el crecimiento de *F. oxysporum* de un 27.2 a 68.7% (Sundaramoorthy y Balabaskar, 2013; Abdelrahman *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). En este estudio, se encontró que el aislado de *T. longibrachiatum* inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* hasta 80%. En contraste, no existen reportes sobre la actividad antagonista de *T. longibrachiatum* contra *F. proliferatum*. Pero otras especies de Trichoderma, como *T. harzianum* y *T. gamsii* inhiben el crecimiento de *F. proliferatum* en 80% (Mondani *et al.*, 2021), similar a lo reportado en este estudio.

En el caso de *N. oryzae*, los estudios de la inhibición del crecimiento de hongos del género *Fusarium* son escasos. El porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* que se encontró en este estudio es mayor al reportado (43.06%) contra *F. solani*. (Hiremani *et al.*, 2020). Mientras que, *N. oryzae* es un endófito de *Tylophora indica* que no muestra actividad antagonista contra *F. oxysporum* (Kumar *et al.*, 2010). Para *F. proliferatum* no existen estudios de la actividad antagonista de *N. oryzae*. En la Figura 3 se muestran los tipos de interacción entre los hongos endófitos y los patógenos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium proliferatum*.

Tipo de interacción	Hongo endófito	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. proliferatum</i>	
		Días de cultivo		Días de cultivo	
		5	15	5	15
Zona de líneas	<i>A. alternata</i> EA10				
	<i>Alternaria</i> sp. EA26				
	EA53				
	<i>Phomopsis</i> sp. EA55				
Sobrecrecimiento	<i>T. longibrachiatum</i> EA54				
Zona de líneas y sobrecrecimiento	<i>A. alternata</i> EA28				
	<i>N. oryzae</i> EA51				

**Figura 3.** Tipos de interacción entre los hongos endófitos de *Ageratina pichinchensis* y los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium proliferatum* en ensayos de cultivo dual.

En la interacción de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* con *A. alternata* EA10, *Alternaria* sp. EA26, *Phomopsis* sp. EA55 y EA53 (no identificado) se observó la formación de una zona de líneas. El tipo de interacción entre *A. alternata* EA28 y los dos patógenos fue diferente dependiendo de la especie de *Fusarium*. Con *F. oxysporum* se observó una zona de líneas mientras que con *F. proliferatum* se observó sobrecrecimiento del endófito sobre el micelio del patógeno. Por el contrario, *N. oryzae* creció sobre el micelio de *F. oxysporum* pero con *F. proliferatum* desarrolló una zona de líneas. *Trichoderma longibrachiatum* creció sobre ambos patógenos y también esporuló sobre ellos.

La presencia de una zona de líneas indica que el mecanismo de la actividad antagónica es la antibiosis (Bertrand *et al.* 2013), por lo que se sugiere que *A. alternata* EA10, *Alternaria* sp. EA26, *Phomopsis* sp. EA55 y el aislado EA53 producen antibióticos contra *Fusarium*.

En la interacción de ‘sobrecrecimiento’, puede involucrar además de la antibiosis, una competencia por nutrientes y espacio (Bertrand *et al.*, 2013). Por lo cual, los resultados en cultivo dual y del tipo de interacción indican que la actividad antagónica de *T. longibrachiatum* con las dos especies de *Fusarium* es la antibiosis y la competencia. Sin embargo, los resultados sobre el tipo de interacción de los hongos *N. oryzae* y *A. alternata* EA28 contra las dos especies de *Fusarium* indican que los mecanismos de interacción dependen de la especie del patógeno. En base a los resultados del ensayo de cultivo dual y los tipos de interacción, se seleccionaron *T. longibrachiatum* y *N. oryzae* para realizar los ensayos de alimento envenenado.

### **Actividad antagónica de metabolitos no volátiles de *Trichoderma* sp. y *N. oryzae* contra *F. oxysporum* y *F. proliferatum***

Los filtrados libres de células de *N. oryzae* no inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* y *F. proliferatum*. Sin embargo, *Trichoderma* sp., inhibió el crecimiento micelial de ambos patógenos; *F. proliferatum* se inhibió 66.5% y *F. oxysporum* en 79.5% (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Actividad antifúngica de los filtrados de los cultivos líquidos de *Trichoderma* sp. y *Nigrospora oryzae* contra *Fusarium oxysporum* y *Fusarium proliferatum*.**

	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Fusarium proliferatum</i>	
	CM (cm <sup>2</sup> )	ICM (%)	CM (cm <sup>2</sup> )	ICM (%)
Control	40.37 ±1.2 a	0	28.78 ±1.1 a	0
<i>Trichoderma</i> sp.	8.27 ±0.7 b	79.5	9.63 ±0.6 b	66.4
<i>N. oryzae</i>	39.37 ±1 a	0	27.87 ±1.5 a	0

Cada valor corresponde a la media ± desviación estándar (n= 5). Valores en la misma columna seguidos por diferentes letras difieren significativamente de acuerdo con la prueba HSD de Tukey ( $p < 0.05$ ). ICM= inhibición del crecimiento micelial; CM= crecimiento micelial.

La técnica del alimento envenenado confirmó que la actividad antagónica de *N. oryzae* no se debió a la producción de antibióticos y que *N. oryzae* inhibe el crecimiento de las dos especies de *Fusarium* por competencia de espacio y nutrientes. Por el contrario, los resultados con *T. longibrachiatum* indican que es un hongo endófito que inhibió el crecimiento de las dos especies de *Fusarium* por la producción de compuestos con actividad antibiótica.

De manera similar, otros autores reportan la actividad antagónica de *Trichoderma* contra cepas de *F. oxysporum*, pero los estudios sobre la actividad antagónica de *T. longibrachiatum* contra *F. proliferatum* son escasos. En base a nuestros resultados la inhibición del crecimiento por los compuestos producidos por *T. longibrachiatum* fue mayor contra *F. oxysporum* que contra *F. proliferatum*. Los estudios futuros podrían enfocarse en caracterizar los metabolitos no volátiles producidos por *Trichoderma longibrachiatum* y evaluar la efectividad contra los dos patógenos.

Las cepas de *T. longibrachiatum* se han aislado de suelo de la rizosfera de un sitio forestal (Zhang *et al.*, 2018), de suelo desértico de Egipto (Abdelrahman *et al.* 2016) y de la rizosfera de *Solanum lycopersicum* L. (tomate) (Sundaramoorthy y Balabaskar, 2013). Pero los estudios sobre la actividad antagónica de *Trichoderma* aislada de hojas y partes aéreas de plantas medicinales son escasos. Sarsaiya *et al.* (2020) reportaron que *T. longibrachiatum* aislada de segmentos de tallo de *Dendrobium nobile* produce dendrobina, un compuesto similar al producido por la planta hospedera y que muestra actividad antibacteriana. Asimismo, *T. longibrachiatum* aislada de la raíz de *Suaeda glauca*, una planta marina, produce sesquiterpenos y ciclodepsipéptidos con actividad antagónica contra patógenos del suelo (Du *et al.*, 2020). Estos estudios muestran el uso potencial de cepas de *Trichoderma* aisladas de planta medicinales con fines agrícolas. Los estudios futuros estarán dirigidos a identificar y caracterizar los metabolitos producidos por *Trichoderma longibrachiatum* aislada de hojas de *A. pichinchensis* con actividad antifúngica contra patógenos.

## Conclusiones

Los hongos endófitos más frecuentes de *A. pichinchensis* pertenecen al filo Ascomycota e incluyen a *Remotididymella anthropophila* y *Diaporthe caatingaensis*, y otros que pertenecen a los géneros *Diaporthe*, *Phomopsis* y *Fusarium*. Los hongos endófitos con actividad antagónica fueron *Alternaria alternata* y *Trichoderma longibrachiatum* y otros que pertenecen a los géneros de *Alternaria* y *Phomopsis*. El único hongo endófito frecuente y que presentó actividad antagónica es *N. oryzae*, que junto con *T. longibrachiatum* sobresalen por su actividad antagónica contra *F. oxysporum* y *F. proliferatum*. Pero difieren en su mecanismo de actividad antagónica, en *T. longibrachiatum* se debe a la producción de compuestos con actividad antibiótica, mientras que la actividad de *N. oryzae* se debe a la competencia de espacio y nutrientes. Este es el primer reporte de *R. anthropophila* como un hongo endófito y de la identificación y la actividad antagónica de hongos endófitos de hojas de *A. pichinchensis*.

## Agradecimientos

La investigación contó con el apoyo económico de la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (proyecto 20220769). A Gabriel Flores Franco (Herbario HUMO, Universidad Autónoma del Estado de Morelos) por la identificación de las plantas. VCL recibió beca doctoral de CONACYT (México) y del programa de Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI-IPN). GSJ y MRM son becarios EDI y COFAA.

## Literatura citada

Abdelrahman, M.; Abdel-Motaal, F.; El-Sayed, M.; Jogaiyah, S.; Shigyo, M.; Ito, S. and Tran, L. P. 2016. Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. cepa by target metabolite profiling. Plant Sci. 246:128-138. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.008>.

- Al-Rashdi, F. K. H.; Al-Sadi, A. M.; Al-Riyamy, B. Z.; Maharachchikumbura, S. S. N.; Al-Sabahi, J. N. and Velazhahan, R. 2020. Endophytic fungi from the medicinal plant *Aloe dhufarensis* Lavranos exhibit antagonistic potential against phytopathogenic fungi. *S. Afr. J. Bot.* 147:1078-1085. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.05.022>.
- Arnold, A. E.; Maynard, Z. and Gilbert, G. S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycol Res.* 105(12):1502-1507. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004956>.
- Aviles, M. and Suárez, G. 1994. Catálogo de plantas medicinales. Jardín Etnobotánico, Centro INAH. Cuernavaca, Morelos, México. 47 p.
- Bertrand, S.; Schumpp, O.; Bohni, N.; Bujard, A.; Azzollini, A.; Monod, M.; Gindro, K. and Wolfender, J. L. 2013. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *J. Chromatogr. A.* 1292:219-228. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.098>.
- Chowdhary, K. and Kaushik, N. 2015. Fungal endophyte diversity and bioactivity in the Indian medicinal plant *Ocimum sanctum* Linn. *PLoS One.* 10(11):1-25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141444>.
- Christian, N.; Sullivan, C.; Visser, N. D. and Clay, K. 2016. Plant host and geographic location drive endophyte community composition in the face of perturbation. *Microb Ecol.* 72(3):621-632. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0804-y>.
- Du, F. Y.; Ju, G. L.; Xiao, L.; Zhou, Y. M. and Wu, X. 2020. Sesquiterpenes and cyclodepsipeptides from marine-derived fungus *Trichoderma longibrachiatum* and their antagonistic activities against soil-borne pathogens. *Mar Drugs.* 18(3):4-13. <https://doi.org/10.3390/md18030165>.
- Egamberdieva, D.; Wirth, S.; Behrendt, U.; Ahmad, P. and Berg, G. 2017. Antimicrobial activity of medicinal plants correlates with the proportion of antagonistic endophytes. *Front Microbiol.* 8(148):1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00199>.
- Fröhlich, J. and Hyde, K. D. 1999. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? *Biodivers Conserv.* 8(3):977-1004. <https://doi.org/10.1023/A:1008895913857>.
- Foster, J. M.; Tayviah, C. S.; Stricker, S. M.; Gossen, B. D. and McDonald, M. R. 2019. Susceptibility to *Stemphylium vesicarium* of asparagus, onion, pear, and rye in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 41(2):228-241. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1574901>.
- Graf, S.; Bohlen, J. H.; Miessner, S.; Wichura, A. and Stammeler, G. 2016. Differentiation of *Stemphylium vesicarium* from *Stemphylium botryosum* as causal agent of the purple spot disease on asparagus in Germany. *Eur. J. Plant Pathol.* 144:411-418. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0777-6>.
- Hardoim, P. R.; Van Overbeek, L. S.; Berg, G.; Pirttilä, A. M.; Company, S.; Campisano, A.; Döring, M. and Sessitsch, A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79(3):293-320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>.
- Hiremani, N. S.; Verma, P.; Gawande, S. P.; Sain, S. K.; Nagrale, D. T.; Salunkhe, V. N.; Shah, V.; Narkhedkar, N. G. and Waghmare, V. N. 2020. Antagonistic potential and phylogeny of culturable endophytic fungi isolated from desi cotton (*Gossypium arboreum* L.). *S. Afr. J. Bot.* 134:329-335. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.008>.

- Kumar, S.; Kaushik, N.; Edrada, E. R.; Ebel, R. and Proksch, P. 2010. Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. World J. Microbiol. Biotechnol. 27:571-577. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0492-6>.
- Lutfia, A.; Munir, E. and Yurnaliza, Y. 2020. Molecular identification of endophytic fungi from torch ginger (*Etilingera elator*) antagonist to phytopathogenic fungi. Biodiversitas. 21(6):2681-2689. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210641>.
- Mei, L.; Zhu, M.; Zhang, D. Z.; Wang, Y. Z.; Guo, J. and Zhang, H. B. 2014. Geographical and temporal changes of foliar fungal endophytes associated with the invasive plant *Ageratina adenophora*. Microb. Ecol. 67(2):402-409. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0319-8>.
- Mondani, L.; Chiausa, G. and Battilani, P. 2021. Chemical and biological control of *Fusarium* species involved in garlic dry rot at early crop stages. Eur. J. Plant Pathol. 160:575-587. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02265-0>.
- Munkvold, G. P. 2017. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. In: Moretti, A. and Susca, A. (Eds.). Mycotoxigenic fungi. Methods in molecular biology. New York: Humana Press. 51-106 pp. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_4).
- Munkvold, G. P. 2003. Mycotoxins in corn-occurrence, impact, and management. In: White, P. J. and Johnson, L. A. (Eds.). Corn: chemistry and technology. St. Paul: American Association of Cereal. 811-881 pp.
- Murali, T. S.; Suryanarayanan, T. S. and Geeta, R. 2006. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. Can. J. Microbiol. 52(7):673-680. Doi: <https://doi.org/10.1139/W06-020>.
- Photita, W.; Lumyong, S.; Lumyong, P. and Hyde, K. D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. Mycol. Res. 105(12):1508-1513. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004968>.
- Rao, N. R. and Pavgi, M. S. 1975. *Stemphylium* leaf blight of onion. Mycopathologia. 56:113-118.
- Ríos, M. Y.; Aguilar, G. B. A. and Navarro, V. 2003. Two new benzofuranes from *Eupatorium aschbornianum* and their antimicrobial activity. Planta Med. 69(10):967-970. <https://doi.org/10.1055/s-2003-45113>.
- Rzedowski, G. C. and Rzedowsky, J. 1985. Flora fanerógamica del Valle de México. Centro Regional del Bajío. Second ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Pátzcuaro, Michoacán. Instituto de Ecología, AC. 450-465 pp.
- Sánchez, F. R. E.; Díaz, D.; Duarte, G.; Lappe, O. P.; Sánchez, S. and Macías, R. M. L. 2015. Antifungal volatile organic compounds from the endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2IIIa: a qualitative change in the intraspecific and interspecific interactions with *Pythium aphanidermatum*. Microb. Ecol. 71(2):347-364. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0679-3>.
- Sarsaiya, S.; Jain, A.; Jia, Q.; Fan, X.; Shu, F.; Chen, Z.; Zhou, Q.; Shi, J. and Chen, J. 2020. Molecular identification of endophytic fungi and their pathogenicity evaluation against *Dendrobium nobile* and *Dendrobium officinale*. Int J Mol Sci. 21(1):1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms21010316>.
- Schmitz, H. X. 1930. Poisoned food technique. Industrial and engineering chemistry. Analyst. 2:361-363.
- Sheikh, F.; Dehghani, H. and Aghajani, M. A. 2015. Screening faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes for resistance to *Stemphylium* blight in Iran. Eur. J. Plant Pathol. 143:677-689. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0718-4>.

- Sundaramoorthy, S. and Balabaskar, P. 2013. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 1(3):36-40. <https://doi.org/10.7324/JABB.2013.1306>.
- Wang, M. X.; Liu, F. X.; Crous, P. W. and Cai, L. X. 2017. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia-Mol Phylogeny Evol. Fungi.* 39:118-142. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.06>
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J. and White, T. J. (Eds.). PCR protocols, a guide to methods and applications.* San Diego. Academic Press, Inc. 315-322 pp.
- Yuen, T. K. and Hyde, K. D. and Hodgkiss, I. J. 1999. Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microb Ecol.* 37(4):257-262. <https://doi.org/10.1007/s002489900151>.
- Zapata-Sarmiento, D. H.; Palacios-Pala, E. F.; Rodríguez-Hernández, A. A.; Medina-Melchor, D. L.; Rodríguez-Monroy, M. and Sepúlveda-Jiménez, G. 2020. *Trichoderma asperellum*, a potential biological control agent of *Stemphylium vesicarium*, on onion (*Allium cepa* L.). *Biol. Control.* 140:104105. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104105>.
- Zhang, S. X.; Xu, B. X.; Zhang, J. X. and Gan, Y. X. 2018. Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens. *Pestic Biochem Physiol.* 47:59-66. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.006>.