

Riqueza foliar de hongos endófitos cultivables aislados de plantas de banano (*Musa spp.*) con manejo orgánico

Foliar richness of cultivable endophytic fungi isolated from banana plants (*Musa spp.*) with organic management

Francisco Felipe Cuevas Morán¹, Ramón López Márquez¹ Angélica María Berlanga Padilla², Miguel Ángel Ayala-Zermeño², Juan Carlos Sánchez Rangel^{1*},

¹Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Autopista Colima-Manzanillo km 40, C.P. 28934, Tecomán, Colima, México. ²Departamento de Control Biológico del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. SENASICA-DGSV km 1.5, Carretera Tecomán-Estación FF.CC., Col. Tepeyac C.P. 28110, Tecomán, Colima, México.

Autor para correspondencia. - jsanchez4@ucol.mx*

RESUMEN

Los hongos endófitos son microorganismos que pueden presentar diversas funciones biológicas tales como actividad promotora de crecimiento vegetal y antagonista contra diferentes fitopatógenos, así como ayudar a la planta a mitigar diferentes tipos de estreses abióticos. Debido a esto, se vuelve relevante conocer los hongos endófitos presentes en diferentes especies vegetales de importancia económica. En este trabajo de investigación se analizó la riqueza foliar de hongos endófitos cultivables de banano (*Musa spp.*), que es uno de los cultivos más importantes en el estado de Colima. A partir de diferentes secciones de hojas jóvenes y adultas de banano con manejo orgánico, se obtuvieron cultivos monoclonales y se caracterizaron macro y micromorfológicamente. Se aislaron 127 hongos, los cuales fueron agrupados en 31 morfotipos. No se observaron diferencias significativas en la tasa de colonización entre las secciones de hoja analizada; sin embargo, la riqueza más alta de endófitos se observó en hojas adultas, siendo mayor el número de morfotipos en secciones con nervadura secundaria (19), seguida de la sección sin nervadura (11), vena principal (6) y pecíolo (3). Los hongos endófitos identificados pertenecen a los géneros *Nigrospora*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Penicillium* y *Aspergillus*, con una frecuencia relativa de 47.2, 18.9, 7.9, 7.1, 1.6 y 0.8%, respectivamente. Estos resultados demuestran que los hongos identificados son fitopatógenos y pueden estar presentes de manera latente en plantas de banano sin generar síntomas de enfermedad.

Palabras clave: *Nigrospora*, fitopatógeno, morfotipo, diversidad, *Penicillium*.

INTRODUCCIÓN

El interés por los hongos endófitos (*i.e.* microorganismos que habitan en el interior de la planta sin generar síntomas aparentes de enfermedad) se ha incrementado en los últimos años debido a que se ha reportado que pueden promover el crecimiento vegetativo, ayudar a la planta a responder a varios tipos de estrés (p. ej. sequía, salinidad, altas temperaturas, toxicidad por metales pesados y estrés oxidativo) y presentar antagonismo contra insectos plaga,

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that can have various biological functions such as plant growth promoting and antagonistic activity against different phytopathogens, as well as helping the plant to mitigate different types of abiotic stresses. Due to this, it becomes relevant to know the endophytic fungi present in different plant species of economic importance. In this research work, the foliar richness of cultivable endophytic fungi in banana (*Musa spp.*), which is one of the most important crops in the state of Colima, was analyzed. From different sections of young and adult banana leaves with organic management, monoclonal cultures were obtained and characterized macro- and micromorphologically. 127 fungi were isolated, which were grouped into 31 morphotypes. No significant differences were observed in the colonization rate between the analyzed leaf sections; however, the highest richness of endophytes was observed in adult leaves, the number of morphotypes being higher in sections with secondary vein (19), followed by the section without vein (11), main vein (6) and petiole (3). The identified endophytic fungi belong to the genera *Nigrospora*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Penicillium* and *Aspergillus*, with a relative frequency of 47.2, 18.9, 7.9, 7.1, 1.6 and 0.8%, respectively. These results demonstrate that the identified fungi are phytopathogenic and can be latently present in banana plants without generating disease symptoms.

Key words *Nigrospora*, phytopathogen, morphotype, diversity, *Penicillium*.

INTRODUCTION

Interest in endophytic fungi (*i.e.* microorganisms that live inside the plant without generating apparent symptoms of disease) has increased in recent years because it has been reported that they can promote vegetative growth, help the plant to respond to types of stress (e.g. drought, salinity, high temperatures, heavy metal toxicity and oxidative stress) and present antagonism against pest insects, phytopathogenic fungi and nematodes (Cao *et al.*, 2002; Dubois *et al.*, 2004; Nuangmek *et al.*, 2008, Souza *et al.*,

hongos fitopatógenos y nematodos (Cao *et al.*, 2002; Dubois *et al.*, 2004; Nuangmek *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2018; Manganyi y Ateba, 2020); además de que representan una fuente abundante de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria, antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena (Manganyi y Ateba, 2020).

La diversidad de endófitos está determinada por la biogeografía, siendo mayor en los trópicos que en los polos; en tanto, a nivel local, la diversidad está influenciada por las condiciones ambientales y la disponibilidad de agua, la temperatura, agroecosistemas y aplicación de productos químicos (Chauhan *et al.*, 2019). Se ha reportado la riqueza de hongos endófitos en diferentes especies vegetales de importancia económica tales como maíz, arroz, limón, palma, papaya, chile habanero, entre otras (Fröhlich *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2012; Potshangbam *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2019; Nicoletti, 2019). No obstante, existen pocos estudios sobre la riqueza de hongos endófitos en *Musa* spp. y la función que estos pueden desempeñar en la planta. Se sabe que los endófitos tienen una distribución asimétrica en el hospedero; particularmente, en *Musa* spp. existe mayor riqueza de hongos endófitos en hojas comparado con raíces, cormo o pseudotallo; siendo más frecuentes los patógenos latentes y, en menor medida, los hongos mutualistas o saprofitos (Zakaria y Aziz, 2018).

Gran parte de los estudios de hongos endófitos se ha realizado en banano con manejo convencional, donde algunos de los géneros reportados son *Fusarium*, *Acremonium*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Gloeosporium*, *Myxosporium*, *Deightonella*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Nigrospora* y *Phoma*, (Pocasangre *et al.*, 2000; Photita *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2002; Zakaria y Aziz, 2018; Malubag *et al.*, 2021). Particularmente, de hojas de banano con manejo orgánico se han aislado los géneros *Peniophora*, *Meyerozyma*, *Saccharicola*, *Byssoschlamys*, *Nigrospora*, *Periconia*, *Acrocalymna* y *Peroneutypa*, siendo *Aspergillus* el más común (Souza *et al.*, 2018).

El estado de Colima ocupa el cuarto lugar como productor de plátano a nivel nacional y es el más importante en la región Centro-Occidente de México, con una producción de 207 433 t y ganancias por 792 millones de pesos (SIAP, 2021). A pesar de la importancia de este cultivo en el estado y de los usos potenciales de los hongos endófitos como promotores de crecimiento y agentes de control biológico, no existen reportes sobre la riqueza de estos microorganismos en plantas de banano con manejo orgánico. A partir de lo anterior, el propósito de esta investigación fue analizar la riqueza foliar de hongos endófitos del banano con este tipo de manejo agronómico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal.

Las muestras de hojas se recolectaron en la plantación de banano con manejo orgánico “Dos Rositas” de la empresa Tropical Organic, ubicada en Caleras, Tecomán (103° 49’

2018, Manganyi and Ateba, 2020); in addition to representing an abundant source of secondary metabolites with antimicrobial, antifungal, antiviral, antiparasitic, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activity (Manganyi and Ateba, 2020).

The diversity of endophytes is determined by biogeography, being greater in the tropics than in the poles, while, at the local level, diversity is influenced by environmental conditions and the availability of water, temperature, agroecosystems, and the application of chemical products (Chauhan *et al.*, 2019). The richness of endophytic fungi has been reported in different plant species of economic importance, such as corn, rice, lemon, palm, papaya, habanero pepper, among others (Fröhlich *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2012; Potshangbam *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2019; Nicoletti, 2019). However, there are few studies on the richness of endophytic fungi in *Musa* spp. and the role they can play in the plant.

Endophytes are known to have an asymmetric distribution in the host; particularly, in *Musa* spp. there is a greater richness of endophytic fungi in leaves compared to roots, corm, or pseudostem; latent pathogens being more frequent and, to a lesser extent, mutualistic or saprophytic fungi (Zakaria and Aziz, 2018).

A large part of the studies of endophytic fungi has been carried out on bananas with conventional management, where some of the reported genera are *Fusarium*, *Acremonium*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Gloeosporium*, *Myxosporium*, *Deightonella*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Nigrospora*, and *Phoma* (Pocasangre *et al.*, 2000; Photita *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2002; Zakaria and Aziz, 2018; Malubag *et al.*, 2021). Particularly, from banana leaves with organic management, the genera *Peniophora*, *Meyerozyma*, *Saccharicola*, *Byssoschlamys*, *Nigrospora*, *Periconia*, *Acrocalymna*, and *Peroneutypa* have been isolated, being *Aspergillus* the most common (Souza *et al.*, 2018).

The state of Colima ranks fourth as a banana producer at the national level and is the most important in the Central-Western region of Mexico, with a production of 207,433 tons and profits of 792 million pesos (SIAP, 2021). Despite the importance of this crop in the state and the potential uses of endophytic fungi as growth promoters and biological control agents, there are no reports on the richness of these microorganisms in organically managed banana plants. Based on the above, the purpose of this research was to analyze the foliar richness of endophytic fungi in bananas with this type of agronomic management.

MATERIALS AND METHODS

Vegetal Material.

The leaf samples were collected at the “Dos Rositas” banana plantation with organic management of the Tropical Organic company, located in Caleras, Tecomán (103° 49’ 4,001” N and 18° 50’ 8,998” W; 2 masl; 1,265 mm depth). mean precipitation), following the procedure reported by Photita *et al.* (2001). 10 banana plants that did not show

49° 4.001'' N y 18° 50' 8.998'' O; 2 msnm; 1265 mm de precipitación media), siguiendo el procedimiento reportado por Photita *et al.* (2001). Se seleccionaron 10 plantas de banano que no presentaban síntomas de enfermedad y que estuvieran al menos a 10 m de distancia entre cada una de ellas. De cada planta, se recolectaron dos hojas adultas (*i.e.* tercera o cuarta hoja recién abierta) y dos hojas jóvenes (*i.e.* primera o segunda hoja recién abierta); se colocaron en bolsas de plástico, se transportaron al laboratorio en una hielera y se procesaron dentro de las 24 h después de la recolecta.

Aislamiento de hongos endófitos.

Las hojas se lavaron con agua del grifo y de cada una se obtuvieron discos de 3 mm de diámetro de la nervadura principal (5 discos), secciones con nervadura secundarias (5 discos), sin nervadura (5 discos) y peciolo (5 discos), utilizando un sacabocados estéril. Los discos fueron esterilizados con etanol 75% (1 min), hipoclorito de sodio 1% (3 min) y etanol 95% (0.5 min); luego, se secaron usando papel estéril y se colocaron en cajas Petri (9 cm de diámetro) con medio agar de extracto de malta (MEA) al 2% (p/v) y sulfato de estreptomycin (50 mg/L). Las cajas Petri se incubaron a 25 °C para promover la esporulación y los fragmentos de tejido que presentaron colonización se colocaron en una caja Petri con medio MEA (Photita *et al.*, 2001). Los aislados fúngicos fueron resemebrados al menos tres veces con el fin de confirmar un crecimiento consistente.

Identificación de los hongos aislados.

Las cepas esporulantes se identificaron a partir de la morfología del conidio y conidióforo y la colonia (Barnett y Hunter, 1998; Crous *et al.*, 2009). En tanto, los aislamientos no esporulantes, o micelio que no esporuló, se identificaron según la textura de la superficie de la colonia, la pigmentación de las hifas, la generación de exudados y las tasas de crecimiento. Para la caracterización micromorfológica, se colocó papel filtro en la parte interior de la caja Petri (9 cm de diámetro), a la cual se colocó un portaobjetos y cubreobjetos estéril; posteriormente, sobre los portaobjetos se colocaron dos secciones de medio PDA de aproximadamente 1 cm² cada uno. Usando un asa bacteriológica estéril se tomaron fragmentos de micelio, se colocaron sobre cada sección de PDA, se cubrieron con cubreobjetos y se agregó agua estéril sobre el papel filtro. Los microcultivos se incubaron a 26 ± 2 °C de 3 a 5 días. Se prepararon laminillas con lactofenol/azul de algodón (10:1) (Riddell, 1950; Mier *et al.*, 2002). Se tomaron fotografías con un microscopio AXIO SCOPE A1 en el objetivo 100× y una cámara digital AxioCam ICc 1 (Carl Zeiss) utilizando el software AxionVision 4.9.1 (03 - 2013).

Análisis estadístico.

La frecuencia de colonización (FC) se determinó usando la fórmula:

$FC = (\text{número total de discos colonizados por sección de hoja} / \text{total de discos analizados}) \times 100$

disease symptoms and that were at least 10 m apart from each other were selected. From each plant, two adult leaves (*i.e.* newly opened first or second leaf) were collected; they were placed in plastic bags, transported to the laboratory in a cooler, and processed within 24 h after collection.

Isolation of endophytic fungi.

The leaves were washed with tap water and from each disc of 3 mm diameter were obtained from the main vein (5 discs), sections with secondary veins (5 discs), without veins (5 discs), and petiole (5 discs), using a sterile punch. The discs were sterilized with 75% ethanol (1 min), 1% sodium hypochlorite (3 min), and 95% ethanol (0.5 min); then, they were dried using sterile paper and placed in Petri dishes (9 cm in diameter) with 2% (w/v) malt extract agar (MEA) medium and streptomycin sulfate (50 mg/L). The Petri dishes were incubated at 25 °C to promote sporulation and the tissue fragments that showed colonization were placed in a Petri dish with MEA medium (Photita *et al.*, 2001). Fungal isolates were replated at least three times to confirm that they showed consistent growth.

Identification of isolated fungi.

The sporulating strains were identified from the morphology of the conidium and conidiophore and the colony (Barnett and Hunter, 1998; Crous *et al.*, 2009). Meanwhile, the non-sporulating isolates, or mycelium that did not sporulate, were identified according to the texture of the surface of the colony, hyphal pigmentation, exudate generation, and growth rates. For the micromorphological characterization, the filter paper was placed inside the Petri dish (9 cm in diameter), to which a sterile slide and coverslip were placed; subsequently, two sections of PDA medium of approximately 1 cm² each were placed on the slides. Using a sterile bacteriological loop, fragments of mycelium were taken, placed on each PDA section, covered with coverslips, and adding sterile water on the filter paper. Microcultures were incubated at 26 ± 2 °C for 3 to 5 days. Slides were prepared with lactophenol/cotton blue (10:1) (Riddell, 1950; Mier *et al.*, 2002). Photographs were taken with an AXIO SCOPE A1 microscope at the 100× objective and an AxioCam ICc 1 digital camera (Carl Zeiss) using AxionVision 4.9.1 software (03 - 2013).

Statistical analysis.

Colonization frequency (FC) was determined using the formula:

$FC = (\text{total number of colonized disks per leaf section} / \text{total disks analyzed}) \times 100$

The total frequency (FT) of morphotypes was calculated from the total number of endophytic fungi isolated in each section of the leaf, while the relative frequency (FR) was determined with the formula:

$FR = (\text{isolates of a given morphotype} / \text{total isolates analyzed}) \times 100$

La frecuencia total (FT) de morfotipos se calculó a partir del número total de hongos endófitos aislados en cada sección de la hoja, mientras que la frecuencia relativa (FR), se determinó con la fórmula:

$$FR = (\text{aislados de un morfotipo determinado} / \text{total de discos analizados}) \times 100$$

Se realizó la prueba *Chi*-cuadrada de bondad de ajustes para determinar si había diferencias significativas en la colonización entre las diferentes secciones de las hojas analizadas usando el programa Minitab versión 16 (Minitab Inc., EE.UU.) (Photita *et al.*, 2001; Bezerra *et al.*, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 127 hongos endófitos de hojas de banano con manejo orgánico, los cuales se agruparon en 31 morfotipos (Cuadro 1). Se obtuvo un mayor número de aislados (67) y morfotipos (26) de hojas adultas comparado con hojas jóvenes (60 aislados, 21 morfotipos). En estas últimas, el mayor número de aislados (33) se obtuvo de las secciones con nervadura secundaria (NS), seguido de los fragmentos sin nervadura (SN) (15), nervadura principal (NP) (9) y pecíolo (P) (3). En hojas adultas se aislaron 36 hongos en secciones NS, seguido de SN (21), NP (7) y P (3). En ambos tipos de hojas, el mayor y menor número de morfotipos se obtuvo en NS y pecíolo, respectivamente. Los morfotipos que presentaron mayor frecuencia relativa fueron el 11 (11.02%), 10 (10.24%), 12, 17 y 18 (7.87% cada uno) y 16 (7.09%) (Cuadro 1).

The *Chi*-square goodness-of-fit test was performed to determine if there were significant differences in colonization between the different sections of the leaves analyzed using the Minitab version 16 program (Minitab Inc., USA) (Photita *et al.*, 2001; Bezerra *et al.*, 2012).

RESULTS AND DISCUSSION

127 endophytic fungi were isolated from banana leaves with organic management, which was grouped into 31 morphotypes (Table 1). A higher number of isolates (67) and morphotypes (26) were obtained in adult leaves compared to young leaves (60 isolates, 21 morphotypes). In the latter, the highest number of isolates (33) was obtained from sections with secondary vein (NS), followed by fragments without vein (SN) (15), main vein (NP) (9) and petiole (P). (3). In adult leaves, 36 fungi were isolated in NS sections, followed by SN (21), NP (7) and P (3). In both types of leaves, the highest and lowest number of morphotypes was obtained in NS and petiole, respectively. The morphotypes that presented the highest relative frequency were 11 (11.02%), 10 (10.24%), 12, 17 and 18 (7.87% each) and 16 (7.09%) (Table 1).

Cuadro 1. Frecuencia absoluta y relativa de los morfotipos aislados de las secciones de hojas jóvenes y adultas de plantas de banano con manejo orgánico.
Table 1. Absolute and relative frequency of the morphotypes isolated from the sections of young and adult leaves of banana plants with organic management.

Morfotipo	FT*	FR (%)	Hojas jóvenes				Hojas adultas			
			SN	NS	NP	P	SN	NS	NP	P
1	3	2.36	1						1	1
2	3	2.36		1				2		
3	4	3.15		2			2			
4	2	1.57	1					1		
5	4	3.15		1	1					2
6	3	2.36						2	1	
7	3	2.36	2							1
8	4	3.15		2				1	1	
9	5	3.94	1	1	1			2		
10	13	10.24		3	4	1	4	1		
11	14	11.02	3	4			4	3		
12	10	7.87		5				5		
13	7	5.51	2	2			1	2		
14	2	1.57					1	1		

15	6	4.72	1	3	1		1		
16	9	7.09	2	2			1	4	
17	10	7.87		2	2	2		2	1 1
18	10	7.87	2				4	4	
19	1	0.79		1					
20	1	0.79		1					
21	2	1.57					1	1	
22	1	0.79							1
23	1	0.79					1		
24	1	0.79						1	
25	1	0.79		1					
26	1	0.79		1					
27	1	0.79					1		
28	1	0.79						1	
29	1	0.79						1	
30	1	0.79		1					
31	2	1.57					1	1	
Total	127	100							

Hongos aislados/sección			15	33	9	3	21	36	7	3
Morfotipos/sección			9	17	5	2	11	19	6	3
Morfotipos/tipo de hoja					21			26		

*FT: frecuencia total; FR: frecuencia relativa; SN: sin nervadura; NS: nervadura secundaria; NP: nervadura principal; P: peciolo.

Photita *et al.* (2001) también encontraron mayor frecuencia relativa de hongos aislados en hojas de banano (*M. acuminata*), siendo mayor en hojas adultas comparado con hojas jóvenes. Esta diferencia puede deberse a que las hojas adultas tienen más tiempo expuestas al ambiente y, por lo tanto, mayor acumulación de endófitos, así como una mayor probabilidad de que suceda una transmisión vertical de endófitos. Por otro lado, Henao *et al.* (2019) aislaron 143 hongos endófitos de banano con manejo convencional, de los cuales 45.46% fueron obtenidos de hojas, 20.28% de raíces, 18.8% del pseudotallo y 16.08% del cormo. Asimismo, identificaron 19, 11 y 3 morfotipos en hojas, raíces y pseudotallo, y aislaron 68 hongos endófitos que no esporularon. Las diferencias en el número de morfotipos identificados en ambos estudios puede deberse al tipo de manejo agronómico, el cual se ha reportado que influye en la diversidad de endófitos (Chauhan *et al.*, 2019)

Con respecto a la tasa de colonización, las secciones SN y NS de hojas adultas presentaron el mismo porcentaje (66%), el cual fue ligeramente mayor a lo observado en SN (56%) y NS (60%) de hojas jóvenes. A su vez, estos valores fueron más altos a los obtenidos en peciolo y NP en ambos tipos de hojas. Sin embargo, no se observaron diferencias

Photita *et al.* (2001) also found a higher relative frequency of isolated fungi in banana leaves (*M. acuminata*), being higher in adult leaves compared to young leaves. This difference may be since adult leaves have more time exposed to the environment and, therefore, greater accumulation of endophytes, as well as a greater probability of vertical transmission of endophytes. On the other hand, Henao *et al.* (2019) isolated 143 banana endophytic fungi with conventional management, of which 45.46% were obtained from leaves, 20.28% from roots, 18.8% from the pseudostem, and 16.08% from corm. Likewise, they identified 19, 11 and 3 morphotypes in leaves, roots and pseudostem, and isolated 68 strains that did not sporulate. The differences in the number of morphotypes identified in both studies may be due to the type of agronomic management, which has been reported to influence the diversity of endophytes (Chauhan *et al.*, 2019).

Regarding the colonization rate, the SN and NS sections of adult leaves presented the same percentage (66%), which was slightly higher than that observed in SN (56%) and NS (60%) of young leaves. In turn, these values were higher than those obtained in petiole and NP in both types of leaves. However, no statistical differences were

estadísticas en las secciones de hojas analizadas ($P>0.464$) (**Figura 1**). Este resultado es diferente a lo reportado por Photita *et al.* (2001) en *Musa acuminata*, donde la tasa de colonización mayor se observó en pecíolo (60.8%), seguido de NP (57.6%), SN (39%) y NS (36.7%). Lo anterior puede deberse a que los híbridos de banano analizados son diferentes en cada estudio y a que los hongos endófitos tienen especificidad por la presencia de sustratos en ciertos tejidos vegetales.

observed in the leaf sections analyzed ($P>0.464$) (**Figure 1**). This result is different from that reported by Photita *et al.* (2001) in *Musa acuminata*, where the highest colonization rate was observed in the petiole (60.8%), followed by NP (57.6%), SN (39%), and NS (36.7%). This may be because the banana hybrids analyzed are different in each study and that endophytic fungi have specificity for the presence of substrates in certain plant tissues.

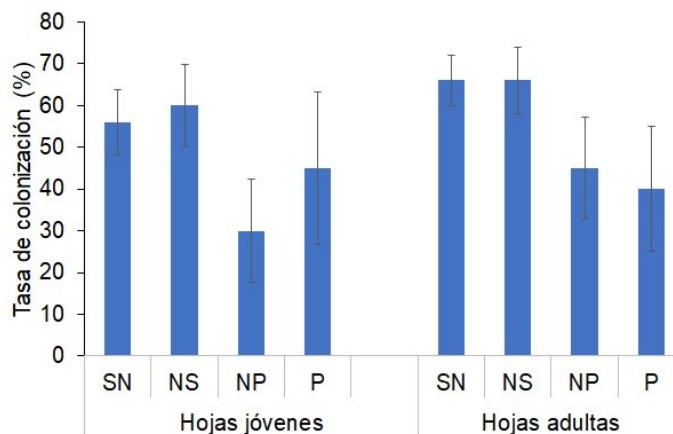


Figura 1. Tasa de colonización de hojas jóvenes y adultas de banano con manejo orgánico. SN: sección de la hoja sin nervadura; NS: nervadura secundaria; NP: nervadura principal; P: pecíolo.



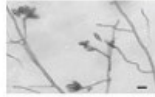











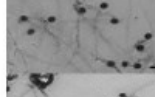

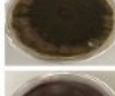

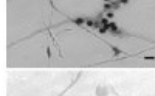

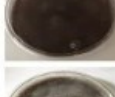

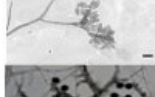


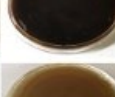






Figure 1. Colonization rate of young and adult banana leaves under organic management. SN: leaf section without vein; NS: secondary rib; NP: main rib; P: petiole.

En el **Cuadro 2** se muestran algunos de hongos endófitos aislados; las colonias con crecimiento circular y de color gris fueron las más comunes (87%), mientras que las de color blanco y forma rizoide las menos frecuentes con 3% y 10%, respectivamente. Asimismo, los conidios circulares de color negro, de forma esferoide, achatados y unicelulares fueron los más comunes, seguidos de conidios cilíndricos con septos y de aislados no esporulantes.

Table 2 shows some of the isolated endophytic fungi; colonies with circular growth and gray color were the most common (87%), while those with white color and rhizoid shape were the least frequent with 3% and 10%, respectively. Likewise, circular conidia of black color, spheroid in shape, and unicellular were the most common, followed by cylindrical conidia with septa and non-sporulating isolates.

Cuadro 2. Crecimiento de la colonia y estructuras fúngicas de algunos de los hongos endófitos aislados de hojas de banano con manejo orgánico. Las barras indican una longitud de 20 μm .

Table 2. Colony growth and fungal structures of some of the endophytic fungi isolated from organically managed banana leaves. The bars indicate a length of 20 μm .

Morfotipo	Anverso	Reverso	Estructuras fúngicas	
1				
4				
6				
10				
11				
12				
18				
23				

En cuanto a los géneros identificados en cada sección de las hojas jóvenes y adultas, *Nigrospora* presentó la mayor frecuencia relativa (47.2%), siendo las secciones NS y SN donde se obtuvieron más aislados de este género. Asimismo, hongos de los géneros *Bipolaris*, *Alternaria*, *Curvularia*, así como micelio que no esporuló fueron más comunes en la sección NS (**Cuadro 3**). Ningún aislado del género *Alternaria* se recuperó de NP y P, en tanto *Nigrospora* fue aislada de las todas las secciones analizadas. Lo anterior puede indicar que algunos hongos tienen preferencia por regiones específicas de la hoja, en tanto, otros tienen una distribución más amplia en este tejido vegetal.

Regarding the genera identified in each section of young and adult leaves, *Nigrospora* presented the highest relative frequency (47.2%), being the NS and SN sections where they obtained more isolates. Likewise, fungi of the genera *Bipolaris*, *Alternaria*, *Curvularia*, as well as mycelium that did not sporulate, were more common in the NS section (**Table 3**). No isolate of the genus *Alternaria* was recovered from NP and P, while *Nigrospora* was isolated from all sections analyzed. This may indicate that some fungi prefer specific regions of the leaf, while others have a broader distribution in this plant tissue.

Cuadro 3. Frecuencia absoluta y relativa de los géneros identificados en cada sección de hoja de banano analizada.

Table 3. Absolute and relative frequency of genera identified in each banana leaf section analyzed.

Orden	Género	Morfotipos	FT	FR (%)	SN	NS	NP	P
Pleosporales	<i>Bipolaris</i>	2, 15	9	7.1	1	7	1	0
Pleosporales	<i>Alternaria</i>	4, 13, 20	10	7.9	4	6	0	0
Pleosporales	<i>Curvularia</i>	1, 3, 8, 12, 22, 26, 30	24	18.9	3	17	3	1
Trichosphaeriales	<i>Nigrospora</i>	10, 11, 16, 17, 18, 24, 28, 31	60	47.2	21	28	7	4
Eurotiales	<i>Aspergillus</i>	23	1	0.8	1	0	0	0
Eurotiales	<i>Penicillium</i>	19, 27	2	1.6	1	1	0	0
Indeterminado	Micelio que no esporuló	5, 6, 7, 9, 14, 21, 25, 29	21	16.5	5	10	5	1

*FT: frecuencia total; FR: frecuencia relativa; SN: sección de la hoja sin nervadura; NS: nervadura secundaria; NP: nervadura principal; P: pecíolo.

Cao *et al.* (2002) observaron una frecuencia relativa menor de *Alternaria* (7.9%), pero mayor para *Penicillium* (3%) y *Aspergillus* (2%) en hojas de *M. acuminata* comparado con las obtenidas en el presente estudio (**Cuadro 3**). Asimismo, estos autores identificaron mayor número de géneros (17) en comparación con los obtenidos en hojas de *M. paradisiaca* con manejo orgánico (7). En tanto, Henao *et al.* (2019) reportaron frecuencias relativas menores para *Nigrospora* (6%) y *Curvularia* (3%), e identificaron hongos de los géneros *Fusarium*, *Phomosis*, *Verticillium*, *Purpureocillium* y *Sordaria* en hojas de banano variedad manzano con manejo orgánico. Estos géneros no fueron identificados en la presente investigación, lo cual puede deberse al tipo de manejo (*i.e.* convencional u orgánico) y a las variedades de banano analizadas en cada estudio.

Por otro lado, Zakaria y Aziz (2018) aislaron 28 hongos endófitos de hojas de *Musa* spp., pertenecientes a los géneros *Pestalotiopsis* (25%) *Nigrospora* (17.8%), *Colletotrichum* (17.8%), *Penicillium* (14.2%), *Fusarium* y *Bipolaris* (7.1% cada uno), *Phoma*, *Lasiodiplodia*, *Cochliobolus* y *Aspergillus* (3.5% cada uno). En la presente investigación, *Nigrospora* y *Aspergillus* presentaron mayor y menor frecuencia, respectivamente; en tanto *Bipolaris* presentó la misma frecuencia (7.1%) que lo reportado por dichos autores. En ambos estudios, la mayoría de los hongos endófitos aislados de banano son patógenos latentes que pueden generar daño a la planta cuando esta tiene escasez de nutrientes y/o excesiva humedad ambiental (Zakaria y Aziz, 2018).

Photita *et al.* (2001) aislaron 7 géneros de hongos a partir *M. acuminata*, siendo *Colletotrichum* (23.9%), *Guignardia* (22.4%), *Dactylaria* (14.9%) y *Cordana* (11.4%) los más comunes en P, SN, pseudotallo y NP, respectivamente. Interesantemente, ninguno de los géneros coincide con los hongos aislados en las mismas secciones analizadas en el presente estudio. Aunado a esto, *Curvularia* y *Nigrospora* presentaron mayor frecuencia relativa en hojas adultas en *M. acuminata*, con 2.6% y 4.7%, respectivamente; no obstante, estos valores fueron menores a los observados

Cao *et al.* (2002) observed a lower relative frequency of *Alternaria* (7.9%), but higher for *Penicillium* (3%) and *Aspergillus* (2%) in *M. acuminata* leaves compared to those obtained in the present study (**Table 3**). Likewise, these authors identified a greater number of genera (17) compared to those obtained (7) in leaves of *M. paradisiaca* with organic management. Meanwhile, Henao *et al.* (2019) reported lower relative frequencies for *Nigrospora* (6%) and *Curvularia* (3%), and identified fungi of the genera *Fusarium*, *Phimosis*, *Verticillium*, *Purpureocillium*, and *Sordaria* in manzano variety banana leaves under organic management. These genera were not identified in this research, which may be due to the type of management (*i.e.*, conventional or organic) and the banana varieties analyzed in each study.

On the other hand, Zakaria and Aziz (2018) isolated 28 endophytic fungi from *Musa* spp. leaves, belonging to the genera *Pestalotiopsis* (25%), *Nigrospora* (17.8%), *Colletotrichum* (17.8%), *Penicillium* (14.2%), *Fusarium*, and *Bipolaris* (7.1% each), *Phoma*, *Lasiodiplodia*, *Cochliobolus*, and *Aspergillus* (3.5% each). In the present investigation, *Nigrospora* and *Aspergillus* presented higher and lower frequency, respectively; while *Bipolaris* presented the same frequency (7.1%) as reported by said authors. In both studies, most of the endophytic fungi isolated from bananas are latent pathogens that can cause damage to the plant when there is shortage of nutrients and/or excessive environmental humidity (Zakaria and Aziz, 2018).

Photita *et al.* (2001) isolated 7 genera of fungi from *M. acuminata*, being *Colletotrichum* (23.9%), *Guignardia* (22.4%), *Dactylaria* (14.9%), and *Cordana* (11.4%) the most common in P, SN, pseudostem and NP, respectively. Interestingly, none of the genera coincide with the fungi isolated in the same sections analyzed in the present study. In addition to this, *Curvularia* and *Nigrospora* presented a higher relative frequency in adult leaves in *M. acuminata*, of 2.6% and 4.7%, respectively; however, these values were lower than those observed in *M. paradisiaca* with organic management. On the other hand, in organically managed

en *M. paradisiaca* con manejo orgánico. Por otro lado, en hojas de banano con manejo orgánico se identificaron 11 géneros (*Aspergillus*, *Peniophora*, *Meyerozyma*, *Saccharicola*, *Nigrospora*, *Byssoschlamys*, *Periconia*, *Myrothecium*, *Acrocalymma* y *Peroneutypa*), siendo los más frecuentes *Aspergillus* (33.3%) y *Peniophora* (25%) (Souza *et al.*, 2018). Las diferencias observadas en la riqueza de hongos endófitos pueden deberse a las condiciones climáticas de la plantación de banano y a la cantidad de muestras analizadas, ya que al tomar más muestras para analizar existe la posibilidad de aumentar el número de fragmentos inoculados por otros géneros (Photita *et al.*, 2001).

Con respecto a los hongos endófitos no identificados (colonias que no esporularon), se observó una frecuencia relativa de 16.5%, la cual es menor a lo reportado por Photita *et al.* (2001) (34.2%), Henao *et al.* (2019) (48%), pero mayor al 6.7% reportado por Cao *et al.* (2002). Las colonias que no esporularon son comunes en estudios de endófitos en los trópicos. Debido a la dificultad para identificar estos hongos, resulta complicado determinar si los endófitos son específicos de un huésped particular (Photita *et al.*, 2001).

De la función que pueden desempeñar los hongos identificados, se sabe que *Curvularia* sp. es un agente causal de la mancha de la hoja en el banano y de la pudrición de la corona, y que puede estar latente en la planta. En tanto, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. pueden ser fitopatógenos, generando Podredumbre de la Corona y la Mancha de la Hoja. No obstante, estos hongos también pueden producir antibióticos y probablemente inhibir el crecimiento de hongos patógenos latentes como *Guignardi musae*, *Deightonella torulosa* y *Fusarium* spp. en las raíces (Cao *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

A nuestro conocimiento, este es el primer reporte de la diversidad foliar de hongos endófitos en banano con manejo orgánico en México. Los resultados obtenidos en esta investigación apoyan estudios previos en los cuales se indican que los hongos fitopatógenos son los endófitos más comunes en hojas de banano. En el presente estudio los géneros *Nigrospora* y *Curvularia* fueron los más abundantes en las hojas de banano analizadas. Este hallazgo es relevante debido a que permite enfocar el monitoreo de plantas con síntomas de enfermedad asociadas a dichos fitopatógenos, así como para el control de estos.

Saccharicola, *Nigrospora*, *Byssoschlamys*, *Periconia*, *Myrothecium*, *Acrocalymma*, and *Peroneutypa*), the most frequent being *Aspergillus* (33.3%) and *Peniophora* (25%) (Souza *et al.*, 2018). The differences observed in the richness of endophytic fungi may be due to the climatic conditions of the banana plantation and the number of samples analyzed, since by taking more samples to analyze there is the possibility of increasing the number of fragments inoculated by other genera (Photita *et al.*, 2001).

Regarding the unidentified endophytic fungi (colonies that did not sporulate), a relative frequency of 16.5% was observed, which is lower than that reported by Photita *et al.* (2001) (34.2%), Henao *et al.* (2019) (48%), but higher than the 6.7% reported by Cao *et al.* (2002). Colonies that did not sporulate are common in studies of endophytes in the tropics. Due to the difficulty in identifying these fungi, it is difficult to determine whether the endophytes are specific to a particular host (Photita *et al.*, 2001).

From the role that the identified fungi can play, it is known that *Curvularia* sp. is a causal agent of banana leaf spot and crown rot and may be dormant in the plant. Meanwhile, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. can be phytopathogenic, generating Crown Rot and Leaf Spot. However, these fungi can also produce antibiotics and probably inhibit the growth of latent fungal pathogens such as *Guignardi musae*, *Deightonella torulosa*, and *Fusarium* spp. in the roots (Cao *et al.*, 2002).

CONCLUSIONS

To our knowledge, this is the first report of the foliar diversity of endophytic fungi in banana under organic management in Mexico. The results obtained in this research support previous studies which indicate that phytopathogenic fungi are the most common endophytes in banana leaves. In the present study, the genera *Nigrospora* and *Curvularia* were the most abundant in the banana leaves analyzed. This finding is relevant because it allows focusing on the monitoring of plants with disease symptoms associated with these phytopathogens, as well as for their control.

Referencias

- Barnett, H.L., and Hunter, B.B., 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota. The American Phytopathological Society. pp. 218.
- Bezerra, P.J.D., Lima, D.M.M., Paiva, L.M., Santos, S.M.G., Fernandes, S.M.J., Souza-Motta, C.M., and Svedese, M.V., 2012. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1989-1995. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22806020/>
- Cao, L. X., You, J.L., and Zhou, S.N., 2002. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18,169-171. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1014491528811>
- Chauhan, N.M., Gutama, A.D., and Aysa, A., 2019. Endophytic fungal diversity isolated from different agro-ecosystem of Enset (*Ensete ventricosum*) in Gedeo zone, SNNPRS, Ethiopia. *BMC Microbiology*, 19,172. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1547-y>
- Crous, P.W., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z., and Samson, R.A., 2009. *Fungal biodiversity*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. CBS Laboratory Manual Series.
- Dubois, T., Gold, C.S., Coyne, D., Paparu, P., Mukwaba, E., Athman, S., ... and Mukwaba, E., 2004. Merging biotechnology with biological control: banana musa tissue culture plants enhanced by endophytic fungi. *Uganda Journal of Agricultural Sciences*, 9,445-451.
- Fröhlich, J., Hyde, K.D., and Petrini, O., 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research*, 104,1202-1212. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756208617803>
- Henaio, S.Z., Vasquez, M.C.H., Hoyos, L.F.P., Torres, J.D.S., and Hoyos-Carvajal, L.M. 2019. Fungal endophytes in bananas cv Manzano affected by Fusarium. *African Journal of Agricultural Research*, 14,430-438. <https://www.musalit.org/seeMore.php?id=18922&recent>.
- Malubag, A.G., Parayao, A.M., and Waing, K.G.D., 2021. Identification of endophytic fungi associated in banana (*Musa paradisiaca* L.) and evaluation of its enzymatic abilities. *International Journal of Agricultural Technology*, 17,941-958. [http://www.ijat-aatsea.com/pdf/v17_n3_2021_May/12_IJAT_17\(3\)_2021_Malubag.%20A.%20G..pdf](http://www.ijat-aatsea.com/pdf/v17_n3_2021_May/12_IJAT_17(3)_2021_Malubag.%20A.%20G..pdf)
- Manganyi, M.C., and Ateba, C.N., 2020. Untapped potentials of endophytic fungi: a review of novel bioactive compounds with biological applications. *Microorganisms*, 8, 1934. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33291214/>
- Minitab, L.L.C., 2021. Minitab. Disponible: <https://www.minitab.com>.
- Mishra, R., Kushveer, J.S., Mohd, I., and Sarma, V., 2019. Evaluation of Antioxidant Potential, DNA Damage Protection and Anticancer Activities of Three Endophytic Fungi Associated with Selected Medicinal Plants. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9, 2321-3272. <https://www.ijpbs.com/abstract.php?iid=1875>
- Mier, T., Toriello, C., and Ulloa, M., 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Nicoletti, R., 2019. Endophytic fungi of citrus plants. *Agriculture*, 9,1-13. <https://ideas.repec.org/a/gam/jagris/v9y2019i12p247-d289218.html>
- Nuangmek, W., McKenzie, H.E.C., and Lumyong, S., 2008. Endophytic Fungi from Wild Banana (*Musa acuminata* Colla) Works Against Anthracnose Disease Caused by *Colletotrichum musae*. *Research Journal of Microbiology*, 3,368-374.
- Paul, N.C., Deng, J.X., Sang, H.-K., Choi, Y.-P., and Yu, S.-H., 2012. Distribution and antifungal activity of endophytic fungi in different growth stages of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) in Korea. *Korean Society of Plant Pathology*, 28, 10-19. <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201216646854803.page>.
- 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. *Mycological Research*, 105,1508-1513.
- Pocasangre, L., Sikora, R., Vilich, V., and Schuster, R., 2000. Survey of banana endophytic fungi from central America and screening for biological control of the burrowing nematode (*Radopholus similis*). *InfoMusa*, 9,3-5.
- Potshangbam, M., Devi, S.I., Sahoo, D., and Strobel, G.A., 2017. Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L. *Frontiers in Microbiology*, 8:325. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00325/full>.
- Riddell, R. W., 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, 42,265-270.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2019. Atlas Agroalimentario 2019. Recuperado de:

Souza Jr., C.A., Marcon, J., Andrade, P.A.M., Silva, J.A., Faraldo, M.I.F., Verdi, M.C.O., Melo, F.A.A., and Azevedo, J.L., 2018. Endophytic bacterial and fungi associated to banana leaves (*Musa* spp.) cultivated under organic management. *Journal of Agricultural Science*, 10,460-467. <https://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/0/36865>.

Zakaria, L., and Aziz, W.N.A., 2018. Molecular identification of endophytic fungi from banana leaves (*Musa* spp.). *Tropical Life Sciences Research*, 29, 201-211. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6072729/>

[https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agro alimentario-2019](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agro%20alimentario-2019).