

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal



ACTIVIDAD PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE ESPECIES DE
***Morchella* PROVENIENTES DE BOSQUE NATIVO Y DE PLANTACIONES**
FORESTALES DEL CENTRO-SUR DE CHILE

MEMORIA DE TITULO PARA
OPTAR AL TITULO DE INGENIERO
EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL

MARÍA JOSÉ ARROYO MARÍN

LOS ÁNGELES – CHILE

2023

**“ACTIVIDAD PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE ESPECIES DE
Morchella PROVENIENTES DE BOSQUE NATIVO Y DE PLANTACIONES
FORESTALES DEL CENTRO-SUR DE CHILE”**

Alumna

**María José Arroyo Marín
Ingeniera en Biotecnología Vegetal**

Profesora Guía

**Dra. Ángela Machuca Herrera
Profesora Asociada
Bioquímico**

Profesor Co-Guía

**Dr. Daniel Chávez Matamala
Profesor Asociado
Ingeniero Forestal**

Jefe de Carrera

**Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero de (E) Forestal**

Directora de Departamento

**Dra. Marely Cuba Díaz
Profesora Titular
Bióloga**



Agradecimientos

Finalizando este largo recorrido en mi formación como profesional, quiero comenzar agradeciendo a mi familia en especial a mis padres Johana y Juan Carlos, por su amor, contención y apoyo incondicional, quienes me enseñaron que la constancia y el esfuerzo daban sus frutos y que por más difícil que se pusiera el camino nunca me rindiera, por esto y por más es que este logro va dedicado a ellos.

Agradecer a mi abuelita Norma, por su inmenso amor y confianza entregada, a mi hermana, por su paciencia, contención, apoyo fundamental durante todo este proceso y por estar siempre en las buenas, pero por sobre todo en las malas, a mis amigos y compañeros Sergio, Paula y Christian por toda la ayuda entregada, las risas, compañía y buenos momentos.

Agradecer también mi profesora guía Angela Machuca por su infinita paciencia, disposición y comprensión y a mi profesor co-guía Daniel Chávez por su gran apoyo y sugerencias entregadas durante esta última etapa, de igual forma agradecer el apoyo y tiempo de la profesora Yudith Guillén quien estuvo siempre dispuesta y presente en el laboratorio.

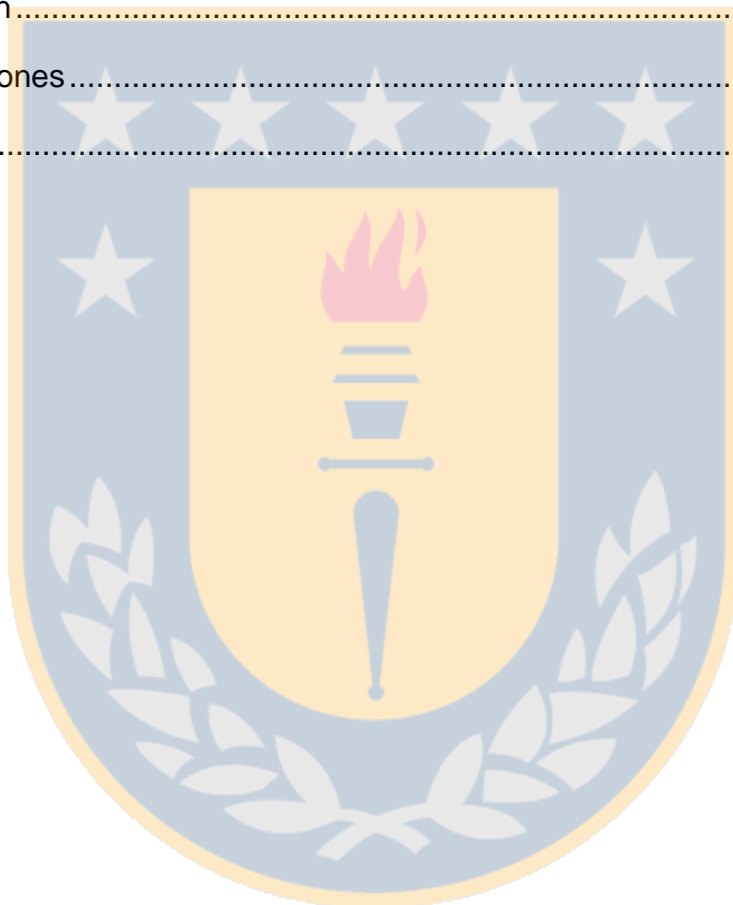
Agradecer a todas las personas que fueron parte de mi vida universitaria y las personas que conocí en mi práctica profesional quienes aportaron de alguna u otra forma en este largo recorrido. Gracias totales.

Por último agradecer al Proyecto VRID- 2021000363 MUL de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción por el apoyo financiero de la tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	3
II. Marco teórico	5
2.1 Hongos como promotores del crecimiento vegetal	6
2.2 Solubilización de fosfato	7
2.3 Compuestos quelantes de Hierro (Fe)	8
2.4 Fitohormonas del tipo auxinas	10
III. Hipótesis	12
IV. Objetivos	12
4.1 Objetivo general	12
4.2 Objetivos específicos	12
V. Metodología	13
5.1 Material fúngico	13
5.2 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfato en medio de cultivo sólido	14
5.3 Detección de agentes quelantes de metal en medio de cultivo sólido	15
5.4 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfato en medio de cultivo líquido	15
5.5 Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida	16
5.6 Detección de agentes quelantes de metal en medio de cultivo líquido	16
5.7 Determinación de auxinas (AIA) en medio de cultivo líquido	17
5.8 Morchellas como hongos promotores del crecimiento de <i>Nicotiana tabacum</i>	18
5.9 Análisis de resultados	19

VI. Resultados	20
6.1 Producción de agentes quelantes de metal en medio de cultivo sólido y líquido.....	20
6.2 Solubilización de fosfato en medio sólido y líquido	23
6.3 Determinación de auxinas (AIA).....	31
6.4 Biomasa aérea y radicular en plantas de <i>N. tabacum</i>	33
VII. Discusión.....	38
VIII. Conclusiones.....	42
Bibliografía	43



ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Crecimiento y reacción CAS de las diferentes cepas de *Morchella* spp. en medio de cultivo EM 2%, durante 18 días de incubación a 24°C. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237)..... 21
- Figura 2.** Porcentaje de unidades de sideróforos (%) de las diferentes cepas de *Morchella* spp. evaluadas en diferentes tiempos de cultivo en medio EM 1%. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos (comparado en forma independiente cada especie con los días 5,10 y 15) con un $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). * indica mayor producción de sideróforos comparado entre especies, siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas en el día 15..... 23
- Figura 3.** Crecimiento y solubilización de fosfato de las diferentes especies de *Morchella* en medio de cultivo PVK, durante 10 días de incubación a 24°C. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237)..... 25
- Figura 4.** Capacidad de solubilización de fosfato por las diferentes cepas de *Morchella* spp. en diferentes periodos de cultivo en medio PVK líquido. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos (comparado en forma independiente cada especie con los días 5,10 y 15) con un $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). * indica mayor concentración de fosfato soluble, siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas en el día 15..... 26
- Figura 5.** Crecimiento de las cepas de *Morchella* spp. en medio PVK determinado como cantidad de biomasa a los 15 días de incubación. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan)..... 27

Figura 6. Actividad enzimática fosfatasa alcalina por las diferentes cepas de *Morchella* spp. en diferentes periodos de cultivo en medio PVK líquido. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos (comparado en forma independiente cada especie con los días 5,10 y 15) con un $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). * indica mayor actividad de fosfatasa alcalina, siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas en el día 15. 29

Figura 7. Actividad enzimática fosfatasa acida por las diferentes cepas de *Morchella* spp. en diferentes periodos de cultivo en medio PVK líquido. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos (comparado en forma independiente cada especie con los días 5,10 y 15) con un $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). * indica mayor actividad de fosfatasa acida, siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas en el día 15. 30

Figura 8. Determinación de auxinas (AIA) de las diferentes cepas de *Morchella* spp. evaluadas en diferentes tiempos de cultivo en medio PD. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos (comparado en forma independiente cada especie con los días 5,10 y 15) con un $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). * indica mayor determinación de auxinas, siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas en el día 15. 31

Figura 9. Crecimiento de las cepas de *Morchella* spp. en medio PD. determinado como cantidad de biomasa a los 15 días de incubación. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). 32

Figura 10. Diferencia de biomasa aérea y radicular de las especies *M. andinensis* 117, *M. tridentina* 226 y *M. importuna* 237. Letras diferentes sobre cada barra

indican diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan)..... 33

Figura 11. Análisis de componentes principales de *M. tridentina* 226, *M. andinensis* 117 y *M. importuna* 237, en la estimulación del crecimiento de *N. tabacum* como planta modelo. Se utilizaron las siguientes variables: Sider (% sideróforos), FS (fosfato soluble (ug/mL), FA (fosfatasa ácida μ moles/min), F.AL (Fosfatasa alcalina μ moles/min), AIA (ácido indol acético), BH (biomasa hongo g), BA (biomasa aérea mg) y BR (biomasa radicular mg), LR (largo raíz cm), IS (índice de solubilización). 35

Figura 12. Gráfica de correlación entre las diferentes variables analizadas. Sider (% sideróforos), FS (fosfato soluble (ug/mL), FA (fosfatasa ácida μ moles/min), F.AL (Fosfatasa alcalina μ moles/min), AIA (ácido indol acético), BH (biomasa hongo g), BA (biomasa aérea mg) y BR (biomasa radicular mg), LR (largo raíz cm), IS (índice de solubilización)..... 36

Figura 13. Crecimiento de *N. tabacum* a los 5 y 15 días de ser inoculadas con *M. tridentina* 226, *M. andinensis* 117 y *M. importuna* 237, respecto a las plantas Control sin inocular. 37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies, cepas y origen de *Morchella* spp. utilizadas en este estudio.. 13

Tabla 2. Crecimiento y reacción CAS en medio de cultivo sólido de las diferentes especies/cepas de *Morchella*. 20

Tabla 3. Índice de solubilización de fosfato en medio de cultivo sólido de las diferentes cepas de *Morchella* spp..... 24

Tabla 4. Cambios en el pH de los caldos de cultivo producidos por las diferentes cepas de *Morchella* spp. durante diferentes periodos de incubación en medio PVK. 28

Tabla 5. Determinación del largo radicular (cm) de plántulas de *N. tabacum*.....34

Lista de abreviaturas

BPCV: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

ACC: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

FANE: fosfatasas ácidas no específicas

N: nitrógeno

P: Fósforo

MSF: microorganismos solubilizadores de fosfato

AIA: Ácido indolacético

HMA: Hongos micorrízicos arbusculares



Resumen

Las especies del género *Morchella* han atraído la atención de micólogos y captado el interés del público en general durante mucho tiempo, son especies de valor comercial, altamente requeridos por la gastronomía gourmet debido a su aroma, sabor, textura carnosa y beneficios para la salud. Aunque es sabido que algunas especies de hongos juegan un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas, lo que conduce a un mayor rendimiento y un aumento en la resistencia a diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos, este tipo de propiedades no han sido investigadas en *Morchella*, a pesar de haber sido reportada en muchas ocasiones asociada a diferentes tipos de vegetación. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar bajo condiciones *in vitro* las actividades promotoras del crecimiento vegetal en especies/cepas de *Morchella* provenientes de bosque nativo y plantaciones forestales del centro sur de Chile, y determinar su efecto en la estimulación del crecimiento de plantas de *Nicotiana tabacum*. Con las cepas 226 y 251 de *M. tridentina*, 110, 117 y 118 de *M. andinensis*, 237 de *M. importuna* y 236 de *M. eximia*, se realizaron ensayos de detección de sideróforos, solubilización de fosfato, actividad de fosfatasa ácida y alcalina, y auxinas del tipo ácido indol acético (AIA). Se evaluó, además, el efecto de *M. tridentina*, *M. andinensis* y *M. importuna*, en la estimulación del crecimiento de *N. tabacum* bajo condiciones *in vitro*. Todas las cepas presentaron reacción positiva para sideróforos en medio sólido, variando el tiempo de reacción (7-8 días) dependiendo de la cepa, siendo más eficientes *M. importuna* 237, *M. andinensis* 110 y 118, y *M. eximia* 236. En medio líquido, *M. tridentina* 226 y *M. andinensis* 118 presentaron la mayor producción de sideróforos. Las mayores actividades de fosfatasa ácida y alcalina se detectaron en *M. eximia* 236 y *M. andinensis* 110, respectivamente, en cuanto que la mayor producción de AIA fue detectada en *M. importuna* 237, seguida de *M. tridentina* 226, y *M. andinensis* 110. Finalmente, en el ensayo *in vitro* del efecto de *Morchella* spp. en el crecimiento de plantas, *M. importuna* 237 y *M. andinensis* 117 fueron las cepas que generaron una mayor producción de biomasa aérea y radicular en *N. tabacum*, siendo especies de interés para evaluar a futuro el efecto promotor del crecimiento en otras especies vegetales de interés agronómico o forestal.

Abstract

Species of the genus *Morchella* have attracted the attention of mycologists and captured the interest of the general public for a long time, they are commercially valuable species, highly demanded by gourmet gastronomy due to their aroma, flavor, meaty texture and health benefits. Although it is known that some fungal species play an important role in promoting plant growth, leading to higher yields and increased resistance to different types of biotic and abiotic stresses, these types of properties have not been investigated in *Morchella*, despite having been reported on many occasions associated with different types of vegetation. Therefore, the objective of this study was to evaluate under in vitro conditions the plant growth-promoting activities of *Morchella* species/strains from native forest and forest plantations of central-southern Chile, and to determine their effect on the growth stimulation of *Nicotiana tabacum* plants. Strains 226 and 251 of *M. tridentina*, 110, 117 and 118 of *M. andinensis*, 237 of *M. importuna* and 236 of *M. eximia* were tested for siderophores, phosphate solubilization, acid and alkaline phosphatase activity, and indole acetic acid (IAA) auxins. The effect of *M. tridentina*, *M. andinensis* and *M. importuna* on the growth stimulation of *N. tabacum* under in vitro conditions was also evaluated. All strains showed positive reaction for siderophores in solid medium, varying the reaction time (7-8 days) depending on the strain, being more efficient *M. importuna* 237, *M. andinensis* 110 and 118, and *M. eximia* 236. In liquid medium, *M. tridentina* 226 and *M. andinensis* 118 showed the highest production of siderophores. The highest acid and alkaline phosphatase activities were detected in *M. eximia* 236 and *M. andinensis* 110, respectively, while the highest AIA production was detected in *M. importuna* 237, followed by *M. tridentina* 226 and *M. andinensis* 110. on plant growth, *M. importuna* 237 and *M. andinensis* 117 were the strains that generated the greatest production of aerial and root biomass in *N. tabacum*, being species of interest for future evaluation of the growth-promoting effect on other plant species of agronomic or forestry interest.

I. Introducción

Los hongos comestibles, tanto silvestres como cultivados, han sido reconocidos como alimentos funcionales debido a sus excelentes características sensoriales, incluido el aroma y sabor únicos que tienen, los cuales han atraído un notable interés en la industria alimentaria (Maity et al., 2021). Estos hongos a su vez son populares por los diversos compuestos bioactivos y el alto valor nutricional, altos contenidos en proteínas, fibra y aminoácidos esenciales, además de ser ricos en compuestos fenólicos (por ejemplo: ácido gálico, ácido protocatecúico, catequina, ácido cafeico, ácido ferúlico y miricetina), policétidos, flavonoides, terpenos, esteroides, β -caroteno, minerales (selenio, zinc, hierro, potasio) y vitaminas como B, C y D (Pérez-Montes et al., 2021).

Dentro de los hongos comestibles se encuentran las especies del género *Morchella* perteneciente a la división Ascomycota, familia Morchellaceae, los cuales son hongos de alto valor comercial, altamente requeridos por la gastronomía gourmet debido a su aroma, sabor, textura carnosa y beneficios para la salud (Dissanayake et al., 2021). Estos hongos, también llamados morillas o colmenillas, han sido consumidas en varias partes del mundo desde hace mucho tiempo, poseen una distribución sub-cosmopolita, siendo posible encontrar especies de *Morchella* en Oceanía, Europa, Asia, América del Sur y América del Norte (Du et al., 2015a).

Muchos hongos exhiben características como la solubilización de minerales, el control biológico y la producción de una variedad de metabolitos secundarios de interés para diferentes industrias. Como tal, muestran un potencial para mejorar o estimular el crecimiento de las plantas cuando están presentes en asociación con las raíces, ya sea como hongos endófitos o micorrícicos (Khan et al., 2010a), y por ello, actuar como organismos promotores del crecimiento vegetal de la misma forma que lo hacen algunas bacterias conocidas como promotoras del crecimiento (BPCV) (Glick, 2012).

Las plantas producen y secretan por sus raíces una amplia gama de compuestos orgánicos, incluidos azúcares, ácidos orgánicos y vitaminas, que las poblaciones microbianas del suelo pueden utilizar como nutrientes o señales (Ortíz-Castro et al., 2009a). Por otro lado, los microorganismos liberan fitohormonas, pequeñas moléculas o compuestos volátiles, que pueden actuar directa o indirectamente para activar la inmunidad de las plantas o regular el crecimiento y la morfogénesis de éstas (Ortiz-Castro et al., 2009a). Dentro de las características que presentan los microorganismos se pueden encontrar la producción de auxinas (como el ácido indol acético), producción de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (AAC) desaminasa, solubilización de fosfato, producción de sideróforos, entre otras (Jasim et al., 2014).

Las especies de *Morchella* han sido encontradas en diferentes ambientes, frecuentemente asociadas a cobertura vegetal, sin embargo, existen muy pocos antecedentes demostrando la existencia de algún tipo de asociación (micorrícica o endófito) con las plantas, y los estudios que demuestren algún efecto estimulador del crecimiento de las plantas son prácticamente inexistentes. Debido a lo mencionado anteriormente, en este estudio se propone evaluar la existencia de actividades promotoras del crecimiento vegetal en algunas especies/cepas de *Morchella* provenientes de bosque nativo y de plantaciones forestales del centro sur de Chile, y determinar el potencial de las cepas como estimuladoras del crecimiento vegetal utilizando *Nicotiana tabacum* como planta modelo, en ensayos *in vitro*.

II. Marco teórico

Las especies del género *Morchella* han atraído la atención de micólogos y captado el interés del público en general durante mucho tiempo. Sin embargo, la clasificación taxonómica en *Morchella*, especialmente a nivel de especie, ha sido históricamente problemática debido a la alta plasticidad de las características morfológicas y la existencia de especies crípticas en el género (Machuca et al., 2021). Estos hongos se reconocen por tener píleos de forma cónica con múltiples alveolos claramente visibles y tamaños variables, y estípites de color amarillento claro, casi cilíndricos y huecos; sus cuerpos fructíferos alcanzan alturas de hasta 15 cm (Uitzil-Colli & Guzmán-Dávalos, 2019). La tonalidad de *Morchella* cambia con la humedad del ambiente y durante sus diferentes etapas de desarrollo (Chung Guin-Po, 2005). Con base en la morfología general, las especies de *Morchella* se ubicaron inicialmente en tres grupos: morchellas negras, morchellas amarillas y morchellas semi-libres (Du et al., 2015). Sin embargo, estudios filogenéticos moleculares posteriores han revelado hasta ahora 78 especies filogenéticas distintas a nivel mundial (Du & Yang 2021), agrupando estas especies en tres clados o grupos filogenéticos: *Rufobrunnea* (morchellas blancas), *Esculenta* (morchellas amarillas) y *Elata* (morchellas negras) (O'Donnell et al. 2011; Du & Yang 2021).

A pesar de los avances en el estudio de estos hongos en otras partes del mundo, el conocimiento sobre su diversidad y relaciones filogenéticas en Sudamérica es limitado (Baroni et al., 2018). En Chile, *Morchella* spp. ha sido encontrada entre la Región de Coquimbo a la Región de Aysén en bosques nativos, zonas cordilleranas, pero también en plantaciones forestales de *Pinus radiata* en zonas costeras, principalmente en condiciones donde ha habido una conversión en el uso del suelo (zonas donde se ha reemplazado el bosque nativo por plantaciones) (Correa & Martínez, 2013; Machuca et al., 2021). En las regiones del Biobío y la Araucanía se han encontrado en plantaciones forestales de pinos y eucaliptos, quemadas o cosechadas (Machuca et al., 2013; Sanz-Rocha et al., 2023).

Hasta el día de hoy, la ecología precisa de las morchellas sigue siendo incierta, aunque está muy claro que no todas las especies comparten los mismos hábitos

tróficos (Loizides, 2017). La mayoría de ellas se consideran saprobias, que se nutren de materia orgánica muerta y tienen un crecimiento de micelio rápido y abundante en varios medios, llegando a producir ascocarpos bajo condiciones controladas (Ower, 1982). Por otro lado se ha informado que varias especies interactúan con las raíces de muchas especies de plantas formando diferentes tipos de asociaciones (Snabl et al., 2019).

Se ha descrito que las especies de *Morchella* fructificaban en ambientes posteriores al incendio asimilando el carbono antiguo, siendo consideradas saprotróficas (Hobbie et al., 2016). En otros estudios se demostró que dos especies de *Morchella* tenían la capacidad para formar una interacción similar a la micorriza en la síntesis de cultivo puro con especies como *Larix occidentalis*, *Pinus contorta*, *Pinus ponderosa* y *Pseudotsuga menziesii* (Dahlstrom et al., 2000), e incluso tener asociaciones tipo endofíticas Como las especies *Morchella sextelata* (Mel-6) y *Morchella snyderi* (Mel-12) asociadas con el fuego al tomar muestras de *Bromus tectorum* (Baynes et al., 2012).

2.1 Hongos como promotores del crecimiento vegetal

Los hongos juegan un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas, lo que conduce a un mayor rendimiento y un aumento en la resistencia a diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos (Domka et al., 2019a). Hasta la fecha se ha estimado que la diversidad de hongos oscila 2,2 a 3,8 millones (Hawksworth & Lücking, 2017). Los hongos que pueden formar una relación simbiótica con las plantas son muy abundantes, algunos promueven el crecimiento vegetal mediante la producción de (fito)hormonas de crecimiento, suprimiendo las infecciones de especies fúngicas patógenas, ayudando a la resistencia sistemática a enfermedades y estrés de las plantas, a la mejora de la eficiencia en el uso de nitrógeno (N) y las relaciones entre agua y nutrientes en las plantas (Yu et al., 2016a). Estos hongos también producen varios metabolitos secundarios que pueden usarse como productos ecológicos para promover el crecimiento de las plantas, como sideróforos, cianuro de hidrógeno, y agentes solubilizantes de fosfato, además de enzimas hidrolíticas (Rana et al., 2020).

Las interacciones que ocurren entre las plantas y sus microorganismos asociados han sido de interés durante mucho tiempo, ya que el conocimiento de estos procesos podría conducir al desarrollo de nuevas aplicaciones agrícolas (Ortiz-Castro et al., 2009b).

Muchos hongos son capaces de solubilizar fosfatos insolubles o facilitar la adquisición de P por parte de las plantas y, por lo tanto, forman una parte importante de los productos microbianos comerciales, siendo *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* los más eficientes (Vassileva et al., 2022).

2.2 Solubilización de fosfato

El fósforo (P) es un macronutriente muy importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo, más del 80% del P aplicado como fertilizante no está disponible para las plantas debido a procesos de absorción, precipitación o inmovilización en la matriz del suelo (Roberts & Johnston, 2015). Junto al N, el P es un nutriente vital para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Su concentración en las plantas oscila entre el 0,05 y 0,5 % del peso seco total de la planta (Khan et al., 2010b). Juega un papel importante en una variedad de procesos celulares, incluido el mantenimiento de las estructuras de la membrana, la síntesis de biomoléculas y la formación de moléculas de alta energía como el ATP. También ayuda en la división celular, la activación/desactivación de enzimas y el metabolismo de los carbohidratos. A nivel de planta entera, estimula la germinación de semillas; desarrollo de raíces, tallo y fuerza del tallo; formación de flores y semillas; rendimiento de los cultivos y calidad. Por lo tanto, es esencial en todas las etapas de desarrollo, desde la germinación hasta la madurez (Malhotra et al., 2018).

En diferentes ecosistemas la reserva de fósforo se encuentra en las rocas, unido al oxígeno formando fosfatos. Cuando las rocas están expuestas al ambiente, la intemperie y la lluvia, estos fosfatos se disuelven, de tal forma que son absorbidos fácilmente a través de las raíces de la planta. La cantidad de fósforo en el suelo se expresa como P_2O_5 y este se clasifica en fósforo inorgánico y fósforo orgánico (Corrales et al., 2014). Los fosfatos orgánicos constituyen del 20 al 30% del fósforo total en el suelo. La disolución de los fosfatos orgánicos se produce a través del

proceso de mineralización mediante la acción de las enzimas (Kumar & Shastri, 2017).

Las fosfatasas ácidas no específicas (FANE) también se conocen como fosfomonoesterasas y son de dos tipos; fosfatasas ácidas y alcalinas que son secretadas por los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF), las cuales se clasifican según el pH óptimo, siendo las enzimas fosfatasas ácidas las que prevalecen en suelos ácidos y las alcalinas en suelos alcalinos o neutros (Nannipieri et al., 2011). La desfosforilación de fosfoésteres o enlaces fosfoanhídrido de compuestos orgánicos es catalizada por fosfatasas. Se ha evidenciado que tanto las fosfatasas ácidas como las alcalinas son excretadas por microorganismos que tienen mayor afinidad con las fosfatasas orgánicas del suelo. Además, las fosfatasas alcalinas hidrolizan alrededor del 90 % del fósforo orgánico total en el suelo y hacen que el fósforo esté disponible para las plantas (Jarosch et al., 2015).

Las fosfatasas ácidas extracelulares (AcPasa) forman un grupo clave de enzimas que pueden movilizar fosfato inorgánico (Pi) de compuestos orgánicos P, ya que catalizan la hidrólisis de ésteres de fosfato para liberar Pi en un ambiente ácido. La actividad de AcPasa en la rizósfera puede tener su origen en raíces de plantas, bacterias y hongos. Los microorganismos solubilizadores de fosfato son bioinoculantes que son sustitutos prometedores de los agroquímicos, que adoptan diferentes estrategias para solubilizar el fósforo insoluble en forma soluble y pueden reducir el aporte de fertilizantes fosfatados en las tierras agrícolas (Rawat et al., 2021).

2.3 Compuestos quelantes de Hierro (Fe)

El hierro (Fe) es uno de los 16 elementos esenciales para el crecimiento y la reproducción de las plantas, es uno de los elementos más abundantes del planeta, un micronutriente esencial para el crecimiento de casi todos los microorganismos vivos porque actúa como catalizador en procesos enzimáticos, metabolismo del oxígeno, transferencia de electrones y síntesis de ADN y ARN (Ahmed & Holmström, 2014).

La deficiencia de Fe afecta el desarrollo de las plantas y disminuye el rendimiento y la calidad de muchos cultivos sensibles, lo que provoca importantes pérdidas económicas. Este desorden nutricional es consecuencia de la baja disponibilidad de Fe en suelos alcalinos, mecanismo defectuoso de absorción de Fe y/o deterioro en el transporte y utilización de Fe en la planta, alterando el metabolismo de la planta (Schalk et al., 2011).

La dinámica del Fe en las plantas comienza con interacciones complejas entre las plantas y la microbiota rizosférica, que determinan la cantidad de Fe disponible para ser absorbido por los transportadores de raíces. En condiciones de deficiencia, se activan dos tipos de sistemas de transporte de alta afinidad, dependiendo de la familia de plantas considerada. En plantas que no son gramíneas, la reducción del quelato de Fe(III) es seguida por la absorción de Fe(II), mientras que en las gramíneas, el Fe(III) es quelado por fitosideróforos secretados los cuales son absorbido posteriormente por las raíces (Lucena & Hernández-Apaolaza, 2017).

Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro de alta afinidad y bajo peso molecular que son excretados por microorganismos y plantas en respuesta al estrés por hierro en el medio ambiente. Estos son los agentes complejantes de iones férricos más fuertes. Actualmente, se conocen más de 500 sideróforos que son producidos tanto por plantas como por microorganismos (Sharma et al., 2013)

En el caso de los microorganismos, éstos producen un grupo de compuestos quelantes para la captación del Fe con una afinidad extremadamente fuerte por el Fe férrico (III), y son más conocidos como sideróforos. A pesar de su preferencia por el Fe (III), también pueden quelar muchos otros metales con afinidades variables (Schalk et al., 2011). La producción de sideróforos por parte de algunos microorganismos los hace exitosos para sobrevivir en varios ambientes adversos y también hace que el Fe limite a los patógenos de las plantas (Miethke & Marahiel, 2007).

Este sistema de captación de Fe involucra la biosíntesis de los sideróforos, la exudación en el espacio extracelular, la movilización del Fe y el reconocimiento y

absorción de los complejos sideróforo-Fe(III) por sistemas de transporte altamente eficientes o liberación del Fe del complejo sideróforo y absorción del Fe (Scavino & Pedraza, 2013).

2.4 Fitohormonas del tipo auxinas

Investigaciones recientes han estudiado ampliamente la producción de fitohormonas por comunidades de hongos y la ingeniería genética de estas fitohormonas para mejorar la tolerancia al estrés abiótico en las plantas. Tales hormonas son moléculas de señalización cruciales que coordinan todos los aspectos del crecimiento, desarrollo y mecanismos de defensa de las plantas. La producción de la fitohormona, particularmente la auxina (AIA) están muy extendidas entre las bacterias que habitan en la rizosfera de las plantas (Maheshwari et al., 2015).

Las fitohormonas se agrupan en cinco clases según la similitud estructural (bioquímica) y el efecto fisiológico en las plantas (o parte de la planta), estas son giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, etileno y auxinas.

El ácido indol acético (AIA) es la primera hormona vegetal del tipo auxina en ser identificada en plantas. El AIA juega un papel clave en la regulación de los procesos relacionados con el crecimiento de las plantas, como la elongación celular, el desarrollo del tejido vascular y la dominancia apical (Fu et al., 2015). Aunque el AIA ha sido ampliamente reconocido por sus implicaciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas, también puede regular la respuesta del crecimiento de la planta frente a condiciones de estrés (Emenecker & Strader, 2020). El AIA también desempeña un papel importante frente a condiciones de salinidad en las plantas de cultivo y se ha establecido un vínculo entre la señalización de auxinas y el estrés salino (Fahad et al., 2015).

Recientemente, la aplicación de hongos endofíticos para promover el crecimiento de las plantas ha sido de interés porque los hongos juegan un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas, lo que conduce a un mayor rendimiento y un aumento en la resistencia a los estreses bióticos y abióticos (Domka et al.,

2019b). Los hongos endófitos podrían colonizar simbióticamente los tejidos internos de las plantas sin causar signos visibles de infección. Además, también producen varios metabolitos secundarios que pueden usarse como productos ecológicos para promover el crecimiento de las plantas (Waqas et al., 2012). Siendo también los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) los que podrían mejorar significativamente el crecimiento de las plantas (Nacoon et al., 2020)

En el caso de la promoción del crecimiento vegetal, los hongos filamentosos de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus* han sido ampliamente estudiados, ya que pueden colonizar e interactuar con las raíces de las plantas a través de varios mecanismos que favorecen el crecimiento de las plantas a través de la absorción de nutrientes, la síntesis de fitohormonas, la inducción de resistencia sistémica y tolerancia al estrés abiótico. Además, como agentes de control biológico, protegen a las plantas contra el ataque de patógenos compitiendo por nutrientes y espacio e inhibiendo el crecimiento de fitopatógenos a través de la producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas (Argumedo-Delira et al., 2022a).

Los mecanismos implicados en la promoción del crecimiento vegetal por parte de los hongos incluyen un mayor acceso a los nutrientes mediante la producción de ácidos orgánicos y sideróforos, la producción de reguladores del crecimiento vegetal (auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico) y la producción de enzimas hidrolíticas (xilanasas, lacasas, pectinasas y celulasas) (Argumedo-Delira et al., 2022b).

Debido a que la ecología de la especie *Morchella* sigue siendo incierta y que los estudios sobre posibles beneficios en el crecimiento de las especies vegetales son prácticamente inexistentes, es que en el presente estudio se buscó determinar la posible capacidad que podrían tener las especies del género *Morchella* provenientes de bosque nativo y plantaciones forestales cosechadas del centro sur de Chile como hongos promotores del crecimiento vegetal.

III. Hipótesis

- Especies/cepas de *Morchella* provenientes de bosque nativo presentan mayores actividades promotoras de crecimiento vegetal que aquellas provenientes de plantaciones forestales, bajo condiciones *in vitro*.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Evaluar bajo condiciones *in vitro* la actividad promotora del crecimiento vegetal en especies/cepas de *Morchella* provenientes de bosque nativo y plantaciones forestales del centro sur de Chile, y determinar su efecto en la estimulación del crecimiento de plantas de *Nicotiana tabacum*.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de solubilización de fosfato y de producción de agentes quelantes de metal de las distintas especies/cepas de *Morchella*, creciendo en medio de cultivo sólido y líquido.
- Determinar la capacidad de solubilización de fosfato, la producción de enzimas fosfatasas y la producción de auxinas de las distintas especies/cepas de *Morchella*, creciendo en medio de cultivo líquido.
- Evaluar el posible efecto estimulante de las especies/cepas de *Morchella* en el crecimiento de plantas, usando como planta modelo a *Nicotiana tabacum*.

V. Metodología

5.1 Material fúngico

El material fúngico utilizado en el presente trabajo correspondió a diferentes cepas o ecotipos de *Morchella tridentina* Bres., *Morchella andinensis* Machuca, Gerding & Chávez, *Morchella importuna* Kuo, O'Donnell & Volk y *Morchella eximia* Boud (Tabla 1). Todos los aislados pertenecen a la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de Hongos del Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción, los cuales fueron mantenidos en medio extracto de malta-agar (EMA) y almacenadas en estufa de incubación a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ como cultivos stock.

Tabla 1. Especies, cepas y origen de *Morchella* spp. utilizadas en este estudio

Espece	Cepa	Origen
<i>Morchella tridentina</i>	226	Palena, Sector Rio Encuentro, Región de Los Lagos. Bosque nativo
<i>Morchella tridentina</i>	251	Quilleco, Sector Peralillo, Región del Bío-bío. Bosque nativo
<i>Morchella andinensis</i>	110	Cochrane, Región de Aysén. Bosque nativo
<i>Morchella andinensis</i>	117	Ñirehuao, Región de Aysén. Bosque nativo
<i>Morchella andinensis</i>	118	Cochrane, Región de Aysén. Bosque nativo
<i>Morchella eximia</i>	236	Santa Fe, Los Ángeles, Región del Biobío. Plantaciones forestales cosechadas
<i>Morchella importuna</i>	237	Santa Fe, Los Ángeles, Región del Biobío. Plantaciones forestales cosechadas

5.2 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfato en medio de cultivo sólido

Para este ensayo se utilizó medio Pikovskaya (PVK) (Laboratorio HiMedia), el cual está compuesto por (g/L): extracto de levadura 0,50, dextrosa 10, fosfato de calcio 5, sulfato de amonio 0,50, cloruro de potasio 0,20, sulfato de magnesio 0,10, sulfato de manganeso 0,0001, sulfato ferroso 0,0001; y suplementado con agar al 1% y Rosa de Bengala al 0,001% (m/v). Este último reactivo se incorporó al medio sólido para facilitar la visualización de la reacción positiva. Se midió el pH del medio de cultivo que fue de 6,3, luego se esterilizó durante 15 min a una presión de 1 atm y 121°C en autoclave Huxley 340. Una vez esterilizado, se dispensaron bajo cámara de flujo laminar 20 mL del medio de cultivo en placas de Petri (9 cm). Las placas se inocularon con un disco de agar-micelio de 5 mm de diámetro en el centro y se dejaron incubando durante una semana en una cámara de crecimiento a 24±1°C en oscuridad. Las placas se inocularon en duplicado por cada cepa fúngica.

Las observaciones se registraron diariamente para evaluar la actividad solubilizadora mediante la aparición de halos transparentes alrededor de las colonias como respuesta a la presencia de fosfato en el medio sólido (Hernández-Leal et al., 2011). Se evaluaron también algunas características morfológicas de los cultivos como tipo de micelio (aéreo, superficial o sumergido), aparición de pigmentación, aparición de esclerocios, a través de observaciones macroscópicas.

Finalmente, se calculó el índice de solubilización de fosfato (IS) mediante la fórmula descrita por Mohamed et al. (2018).

$$IS = \frac{\text{Diámetro de la colonia} + \text{halo de solubilización}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

5.3 Detección de agentes quelantes de metal en medio de cultivo sólido

Para la detección de la producción de agentes quelantes de metal del tipo sideróforos por las diferentes cepas fúngicas, se utilizó el ensayo que usa el reactivo universal Chrome Azurol S (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987; Himpsl & Mobley, 2019). Para ello, se prepararon placas de Petri (9 cm) conteniendo, agar-CAS (azul) en una de sus mitades y medio de cultivo EMA 2% (pH 6,0) en la otra mitad, todo bajo condiciones estériles. Las placas se inocularon con un disco de agar-micelio (5 mm de diámetro) tomado de los cultivos stock de cada cepa fúngica, en la mitad que contenía el medio de cultivo EMA 2%, y posteriormente se incubaron en estufa a 24°C durante 18 días. La determinación cualitativa de la producción de compuestos quelantes se evaluó a través de un cambio de color del agar-CAS, desde el azul al anaranjado o marrón. Todas las cepas fueron inoculadas en duplicado en cada medio de cultivo, y terminado el ensayo se evaluó en forma semi-cuantitativa el crecimiento micelial (diámetro final en cm de las colonias) y la magnitud de la reacción CAS (avance en cm del cambio de coloración en la mitad azul de las placas) (Milagres et al., 1999).

5.4 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfato en medio de cultivo líquido

Para este ensayo se utilizó el mismo medio PVK del ensayo anterior, solamente que no se le incorporó agar ni Rosa de Bengala, y el pH del medio se ajustó a 5,8. Luego, se dispensaron 100 mL de medio en matraces Erlenmeyer (250 mL), para proceder a esterilizarlos en autoclave a 121°C, 1 atm por 15 min. Cada cepa se inoculó en duplicado utilizando 4 discos de agar micelio (5 mm) por matraz. Se prepararon controles con el medio PVK sin inocular. La incubación de los matraces se realizó en agitación constante a 100 rpm por 15 días, a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (Munir et al., 2022). Bajo cámara de flujo laminar se tomaron muestras de aprox. 10 mL cada 5 días durante el periodo de cultivo. Se procedió a filtrar en filtro de jeringa (0,2 μM) y se midió el pH del filtrado con un pHmetro (HANNA HI4211).

En el filtrado de cada caldo de cultivo se cuantificó el fósforo soluble por colorimetría, a través de la formación del complejo molibdofosfórico reducido con ácido ascórbico

(Murphy, 1962). Para ello, se mezcló 1 mL de la muestra filtrada con la solución reveladora de fosfato (molibdato de amonio 40%, ácido ascórbico 0,1 M, tartrato de antimonio y potasio 0,1 M y ácido sulfúrico 5 N). Finalmente, se incubó la muestra durante 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (TU-1810, split Beam UV-Vis) a una longitud de onda de 880 nm. El resultado positivo de la presencia de fosfato soluble en las muestras fue indicado por la formación de un color azul (Munir et al., 2022). Se construyó una curva de calibración de fosfato monopotásico para transformar los valores de absorbancia en mg/L de fosfato soluble (Anexo 1). Al finalizar el periodo de incubación (15 días) se separó la biomasa fúngica del medio líquido mediante filtración con papel filtro (previamente seco y pesado) utilizando bomba de vacío. La biomasa se cuantificó y expreso como peso seco (g).

5.5 Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida

La actividad de fosfatasa se determinó en los filtrados de los caldos cosechados cada 5 días en el ensayo anterior (ítem 5.4). Para ensayar la actividad de fosfatasa alcalina, se tomó 1 mL de tampón hidróxido de sodio-glicina (pH 9, 0,1 M) en un tubo de ensayo y se le añadió 0,4 mL de extracto enzimático. Esto fue seguido por la adición de 0,5 mL de sustrato enzimático p-nitrofenol fosfato (pNPF) y 0,1 mL de MgCl₂ a la mezcla de reacción. Se siguió el mismo procedimiento para el ensayo de fosfatasa ácida, excepto porque se usó tampón citrato (pH 5, 0,1 M). Los tubos se incubaron a 25 °C durante 30 min, luego de lo cual se añadió 100 µL de NaOH (5 M) y se midió la liberación de p-nitrofenol a 400 nm en un espectrofotómetro (TU-1810, split Beam UV-Vis). Se construyó una curva de calibración con p-nitrofenol que permitió transformar los valores de absorbancia en actividad enzimática (Adhikari & Pandey, 2019) (Anexo 2 y 3). La actividad de fosfatasa (ácida y alcalina) se expresó como [UI/L].

5.6 Detección de agentes quelantes de metal en medio de cultivo líquido

La producción de agentes quelantes de metal del tipo sideróforos se evaluó en las diferentes cepas de *Morchella* cultivadas en medio líquido. Para ello, se prepararon

matraces (100 mL) conteniendo 40 mL de medio extracto de malta (EM) 1%, con ajuste de pH a 6, y se inocularon en duplicado con 2 discos de agar-micelio (5 mm) de las distintas cepas, utilizando caldo sin inocular como control. Los matraces se incubaron en agitación a 120 rpm a 25°C, durante 15 días.

Bajo cámara de flujo laminar se tomaron muestras de aprox. 5 mL cada 5 días durante el periodo de cultivo, las cuales se filtraron al vacío usando papel de filtro. De los filtrados se tomaron alícuotas de 1 mL de extracto y se mezcló con 1 mL del reactivo CAS-líquido, preparado de acuerdo con la literatura (Schwyn & Neilands, 1987). Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se procedió a cuantificar la producción de agentes quelantes a través de espectrofotometría (Espectrofotómetro TU-1810 Split Beam UV-VIS), midiendo la absorbancia a 630 nm. Finalizado el ensayo se determinó el porcentaje de agentes quelantes producidos por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ agentes quelantes} = \frac{[Ar - As]}{Ar} \times 100$$

Donde:

Ar = Absorbancia del control

As = Absorbancia de la muestra

5.7 Determinación de auxinas (AIA) en medio de cultivo líquido

Para la determinación de la producción de auxinas por las diferentes cepas de *Morchella* creciendo en medio líquido, se siguió la metodología descrita en la literatura (Sadaf et al., 2009). Se utilizó el medio de cultivo caldo de papa dextrosa (PD, Merck) suplementado con L-triptófano (1 mg/mL). Matraces (100 mL) conteniendo 40 mL del medio de cultivo, se inocularon con 2 discos de agar micelio (5 mm) y se incubaron por 15 días en agitación (120 rpm) a 24°C. Los matraces se inocularon en duplicado por cada cepa fúngica, y se prepararon controles conteniendo el medio de cultivo sin inocular. Bajo cámara de flujo laminar se

tomaron alícuotas de aprox. 5 mL de cada matraz a cada 5 días, durante el periodo de incubación. Las alícuotas se centrifugaron y en los sobrenadantes se determinó la concentración de auxinas del tipo AIA (Sadaf et al., 2009). Para ello, se preparó el reactivo de Salkowski, mediante una solución de 15 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M) a la que se añadió 300 mL de H_2SO_4 (98%) y 500 mL de agua destilada (Acuña et al., 2011). Luego, 1 mL de sobrenadante y se mezcló con 4 mL del reactivo de Salkowski, dejando reposar a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad por 30 min, posteriormente se midió la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro (TU-1810 Split Beam UV-VIS). Para cuantificar la producción de auxinas se preparó una curva de calibración (Anexo 3) a partir de concentraciones conocidas de AIA (10-50 mg/L). La reacción positiva exhibe una coloración rosa, que se debe a la formación del complejo tris-(indol-3-acetato)-Fe (III) entre el reactivo de Salkowski y el AIA (Gordon & Weber, 1951).

Al finalizar el periodo de incubación (15 días), se separó la biomasa fúngica del medio líquido mediante filtración con papel filtro (previamente seco y pesado) utilizando bomba de vacío. La biomasa se cuantificó y expresó como peso seco (g).

5.8 Morchellas como hongos promotores del crecimiento de *Nicotiana tabacum*

Para este ensayo se utilizaron semillas de *Nicotiana tabacum* y se seleccionaron 3 cepas de hongos *M. tridentina* 226, *M. Andinensis* 117 y *M. importuna*, las cuales mostraron mejores resultados de producción de ácido indol acético (AIA) (Item 5.7).

La esterilización de las semillas se realizó con un lavado con etanol al 70% durante 1 min agitando suavemente, posteriormente se trató las semillas con cloro, luego se le agrego una gota de tween 20 durante 10 min agitando vigorosamente la suspensión cada 2 min, finalmente se procedió a enjuagar con agua estéril.

Para la germinación de semillas se preparó medio MS completo, sacarosa 3% y agar 0,7%, se ajustó pH a 5,6 y se procedió a autoclavar durante 15 min a una presión de 1 atm y 121°C (Zhang et al., 2006). Una vez esterilizado, se dispensaron

bajo cámara de flujo laminar 40 mL del medio en placas de Petri cuadradas y se dejaron incubando durante 15 días en una cámara de crecimiento a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Se seleccionaron plántulas con hojas verdaderas y que tuvieran crecimiento de raíz y se pasaron al medio MS completo con sacarosa 3% y agar 0,7% se trabajó en triplicado con 3 plántulas por cada especie de *Morchella* y se le añadió 2 inóculos de 0,5 mm, para el control se trabajó en duplicado con 3 plántulas sin inocular. Finalizada las 3 semanas se realizaron mediciones de largo de raíz (cm), biomasa aérea y radicular a través de la determinación del peso seco (mg).

5.9 Análisis de resultados

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar la varianza de los datos experimentales por duplicado utilizando el programa Statistica v10. Para los datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia se realizó transformación de variable. La significación estadística se determinó usando el test de Duncan ($p < 0,05$). Para los valores porcentuales fueron transformados a través de $\sqrt{x/100}$. Se realizó un análisis multivariado usando la correlación de Pearson y un análisis factorial usando la extracción del componente principal (PC) (Chávez et al., 2020).

VI. Resultados

6.1 Producción de agentes quelantes de metal en medio de cultivo sólido y líquido

Al evaluar el crecimiento a través del diámetro de las colonias *M. tridentina* 226, *M. andinensis* 110 y 117, *M. eximia* y *M. importuna*, presentaron los mayores crecimientos (> 5 cm), mientras que la cepa 251 de *M. tridentina* presentó el menor crecimiento bajo las mismas condiciones de cultivo (Tabla 2).

Se detectó que todas las cepas mostraron reacción CAS positiva en el medio de cultivo, pero con diferencias en el tiempo de aparición de la reacción. *M. importuna* 237 fue la primera especie en mostrar reacción en la mitad azul de las placas (agar-CAS) a los 7 días de incubación, mientras que *M. eximia* y las cepas 110 y 118 de *M. andinensis* mostraron reacción al día 8. Las cepas 117 de *M. andinensis* y 226 de *M. tridentina* mostraron reacción entre los 12-13 días y la cepa 251 fue la más demorada, reaccionando al día 18 de incubación (Fig. 1). En cuanto a los aspectos visuales de la reacción, todas las especies mostraron un cambio en la mitad agar-CAS desde el azul al café anaranjado.

Tabla 2. Crecimiento y reacción CAS en medio de cultivo sólido de las diferentes especies/cepas de *Morchella*.

Especie	Cepa	Aparición de reacción (días) ^a	Crecimiento (cm) ^b	Reacción (cm) ^c
<i>M. tridentina</i>	226	12-13	5,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1
	251	18	1,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0
<i>M. andinensis</i>	110	8	5,4 ± 0,2	1,6 ± 0,0
	117	12-13	5,2 ± 0,2	0,7 ± 0,2
	118	8	4,4 ± 0,1	1,2 ± 0,0
<i>M. eximia</i>	236	8	5,5 ± 0,0	0,8 ± 0,1
<i>M. importuna</i>	237	7	5,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1

a: tiempo de aparición de la reacción sobre la mitad agar-CAS (días); b: crecimiento determinado como diámetro de las colonias al término del ensayo; c: distancia del avance de la reacción en la mitad agar-CAS. Los valores corresponden al promedio de 2 réplicas ± DE, medidos a los 18 días de incubación.

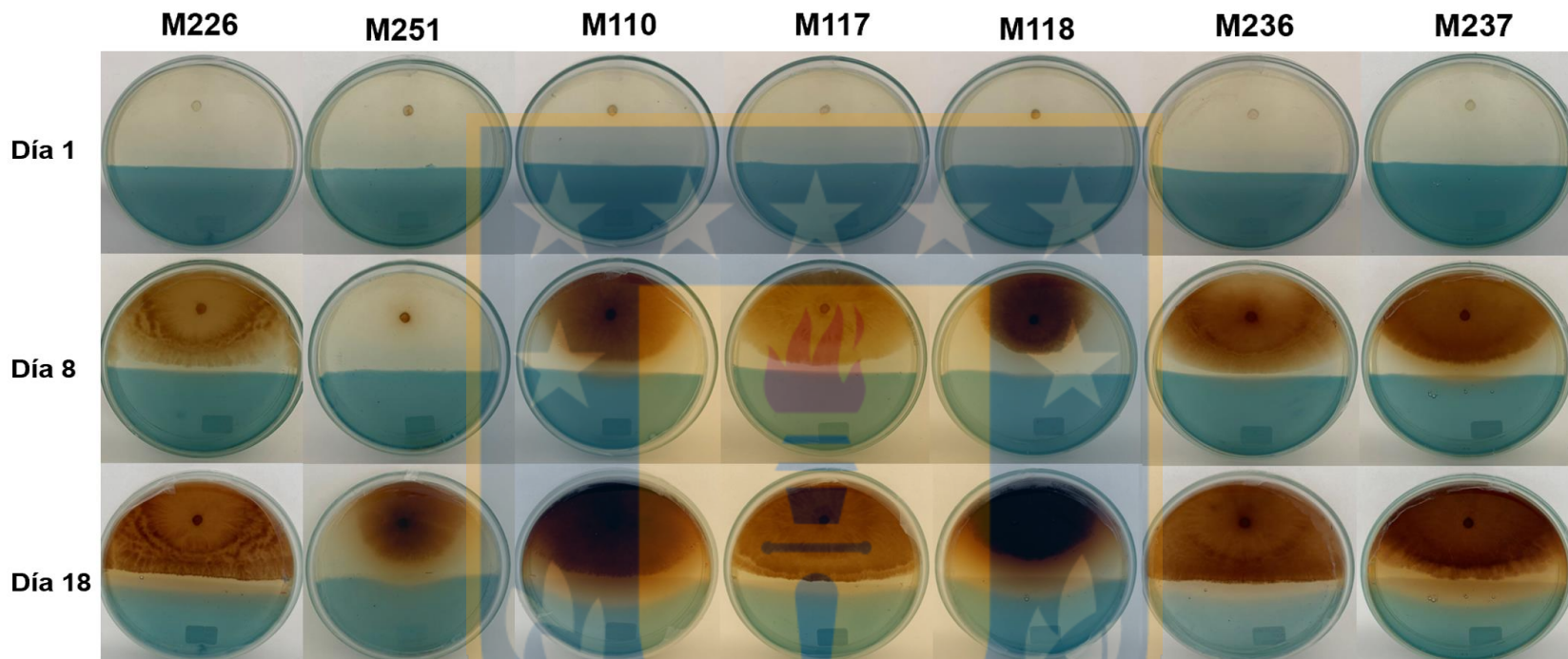
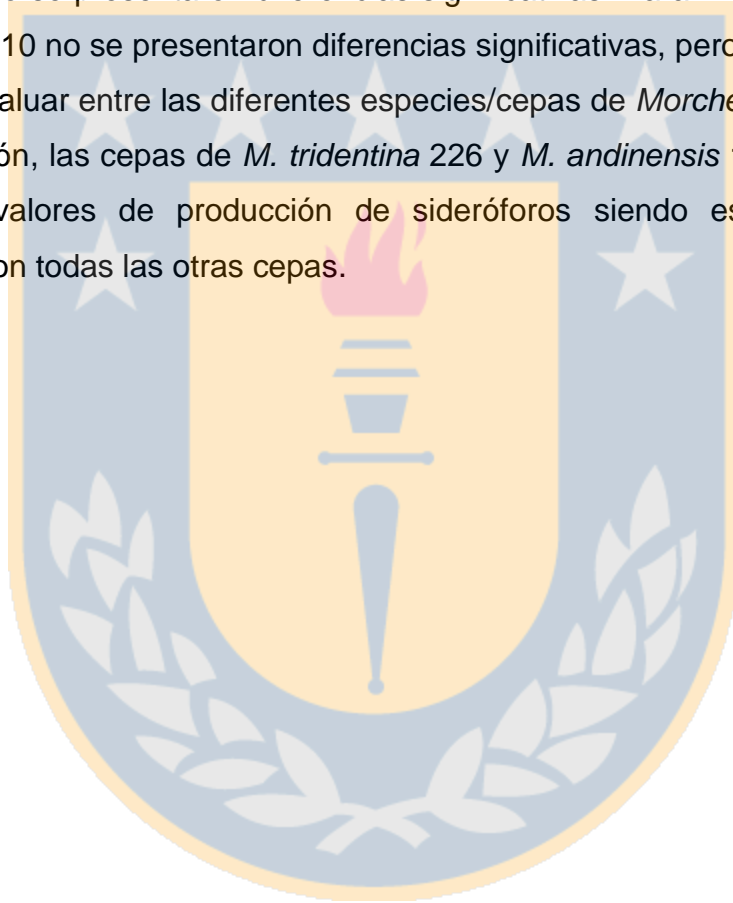


Figura 1. Crecimiento y reacción CAS de las diferentes cepas de *Morchella* spp. en medio de cultivo EM 2%, durante 18 días de incubación a 24°C. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237).

La determinación de compuestos quelantes también se realizó en medio de cultivo líquido, luego que las diferentes cepas de *Morchella* spp. crecieran en medio EM 1% (Fig. 2). Las especies que mostraron diferencias significativas en los 3 días de medición (5, 10 y 15 días respectivamente) fueron *M. tridentina* 226, 251, *M. andinensis* 118 y *M. eximia* 236 aumentando la producción de sideróforos con el tiempo. *Morchella andinensis* 117 y *M. importuna* 237, presentaron diferencias significativas entre los días 5 de medición en comparación con los días 10 y 15, en estos últimos no se presentaron diferencias significativas. Para *M. andinensis* 110 en los días 5 y 10 no se presentaron diferencias significativas, pero si entre estos y el día 15. Al evaluar entre las diferentes especies/cepas de *Morchella* solo a los 15 días de medición, las cepas de *M. tridentina* 226 y *M. andinensis* 118 presentaron los mayores valores de producción de sideróforos siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas.



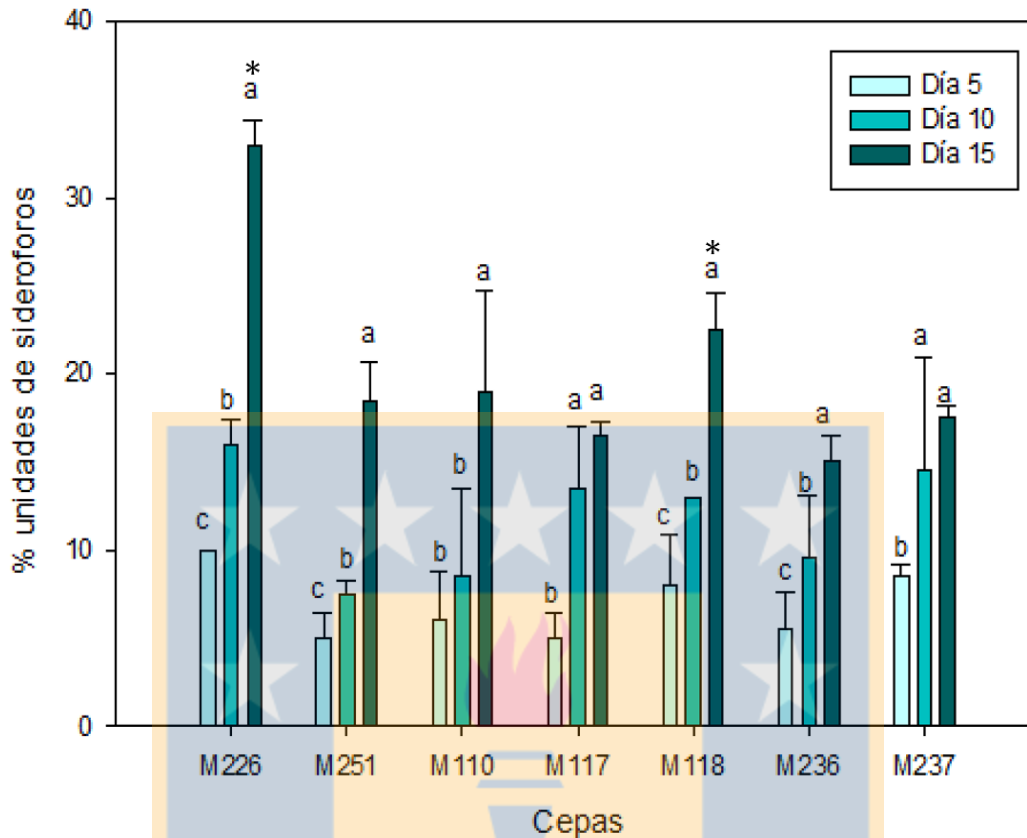


Figura 2. Porcentaje de unidades de sideróforos (%) de las diferentes cepas de *Morchella* spp. evaluadas en diferentes tiempos de cultivo en medio EM 1%. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos (comparado en forma independiente cada especie con los días 5, 10 y 15) con un $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). * indica mayor producción de sideróforos comparado entre especies, siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas en el día 15.

6.2 Solubilización de fosfato en medio sólido y líquido

Todas las especies de *Morchella* crecieron en el medio de cultivo PVK, algunas con un crecimiento micelial muy rápido como *M. tridentina* 226 y *M. eximia*, con formación de abundante micelio algodonoso y aéreo. El crecimiento micelial de las cepas siguió la tendencia *M. tridentina* 226 \approx *M. eximia* > *M. importuna* > *M. tridentina* 251 \approx *M. andinensis* 117 > *M. andinensis* 110 > *M. andinensis* 118 (Fig.

4). Además, se apreció que las cepas de *M. andinensis* y *M. tridentina* 251 mostraron una leve pigmentación en los micelios. Por otra parte, las colonias de todas las cepas mostraron bordes muy irregulares y en ninguna de las placas se observó presencia de esclerocios durante el tiempo de duración del ensayo (10 días).

La presencia de un halo traslúcido alrededor de las colonias de algunas especies de *Morchella* indicó la capacidad de solubilización de los fosfatos del medio PVK (Fig. 4). El halo se comenzó a ver desde el tercer día de incubación en las especies *M. importuna* y *M. andinensis* cepas 110, 117 y 118, mientras que *M. eximia* y *M. tridentina* mostraron rápido crecimiento micelial, pero no solubilización de fosfato (Fig. 4). Entre las especies de *Morchella* que presentaron halo de solubilización, el IS fue variable y se encontraron valores entre 1,6 y 3,3, siendo los máximos valores detectados en los cultivos de las cepas 110 y 118 de *M. andinensis* (Tabla 3).

Tabla 3. Índice de solubilización de fosfato en medio de cultivo sólido de las diferentes cepas de *Morchella* spp.

Especie	Cepa	Diámetro de la colonia (cm)	índice solubilización
<i>M. tridentina</i>	226	8,8	n.d
	251	3,7	n.d
<i>M. andinensis</i>	110	1,5	3,0 ± 0,0
	117	5,6	1,8 ± 1,2
	118	1,2	3,3 ± 0,5
<i>M. eximia</i>	236	8,3	n.d
<i>M. importuna</i>	237	4,0	1,6 ± 1,0

Los valores de IS corresponden al promedio de 2 réplicas ± DE, medidos a los 10 días de incubación. n.d.: no determinado por no presentar halo de solubilización.

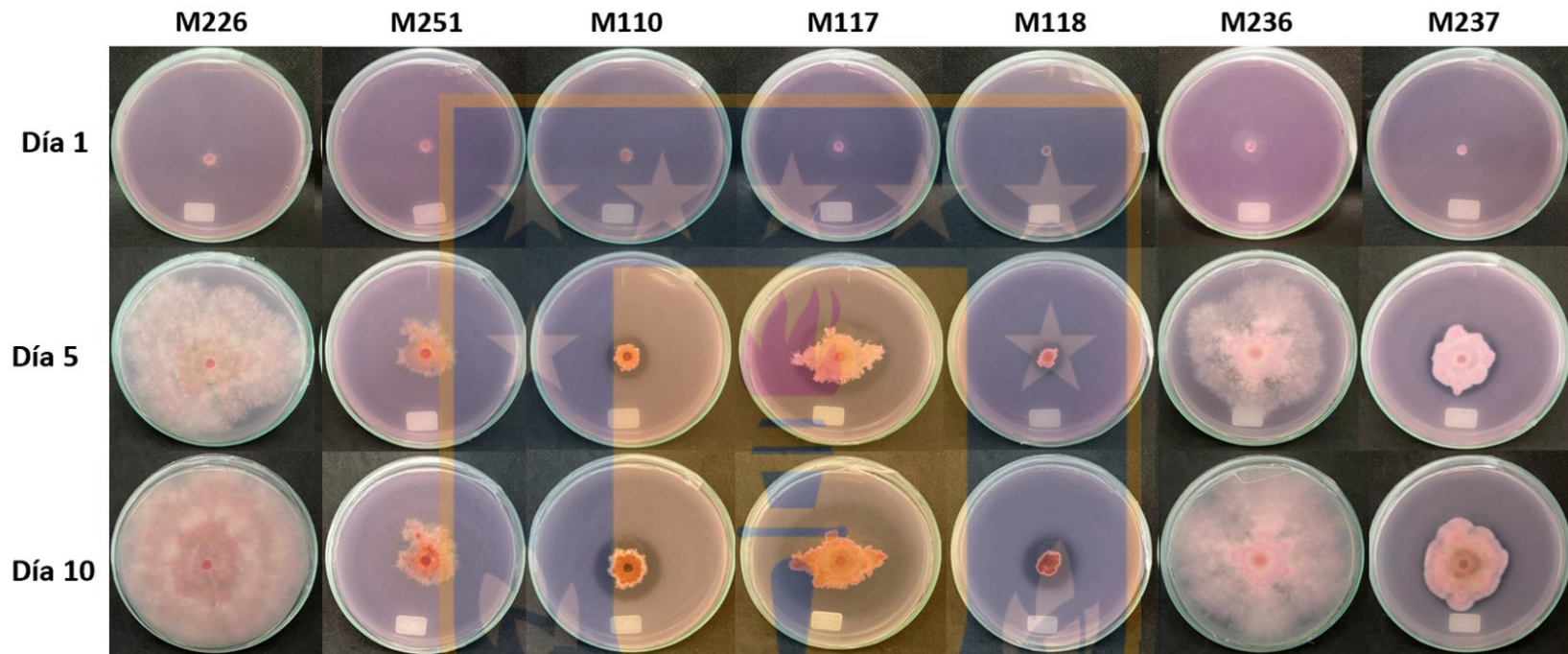


Figura 3. Crecimiento y solubilización de fosfato de las diferentes especies de *Morchella* en medio de cultivo PVK, durante 10 días de incubación a 24°C. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237).

La determinación de fosfato soluble se realizó en medio de cultivo líquido, luego que las diferentes cepas de *Morchella* spp. crecieran en medio PVK (Fig. 5). Las especies que mostraron diferencias significativas entre los días 5, 10 y 15 fueron *M. andinensis* 117, 118, *M. eximia* 236 y *M. importuna* 237 en comparación al resto de las otras cepas que presentaron diferencia sólo en el día 15. Al analizar todas las especies en el día 15, se concluyó que *M. eximia* 236, *M. importuna* 237, *M. andinensis* 110 y *M. tridentina* 226 presentaron las mayores concentraciones de fosfato soluble (40,85, 35,81, 30,80 y 27,32 ug/L respectivamente) no presentando diferencias significativas entre ellas, pero si con las demás cepas.

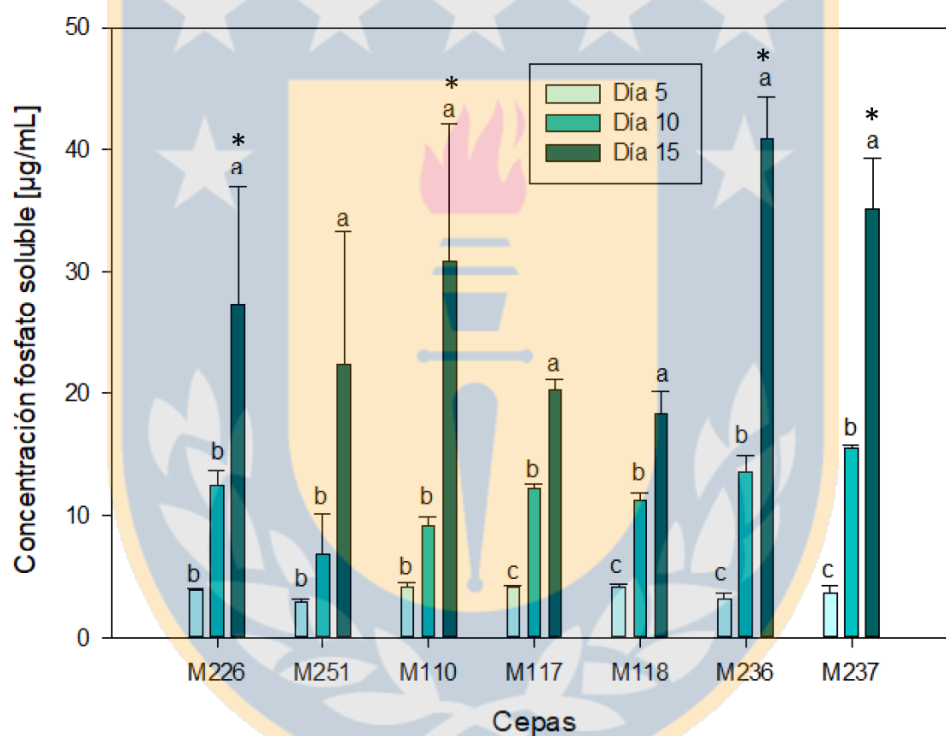


Figura 4. Capacidad de solubilización de fosfato por las diferentes cepas de *Morchella* spp. en diferentes periodos de cultivo en medio PVK líquido. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos (comparado en forma independiente cada especie con los días 5,10 y 15) con un $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). * indica mayor concentración de fosfato soluble, siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas en el día 15.

Todas las cepas de *Morchella* spp. mostraron un crecimiento micelial diferente, (determinado como la producción de biomasa) al finalizar el periodo de incubación (15 días) para la determinación de fosfato soluble (Fig. 3). *Morchella tridentina* 251 presentó la mayor producción de biomasa 0,117 g, siendo estadísticamente diferente con, *M. eximia* (236), *M. importuna* (237) y *M. andinensis* 118, esta última fue quién presentó los valores más bajos de biomasa 0,044 g, siendo estadísticamente diferente con todas las demás cepas estudiadas. Se destaca que entre las cepas de *M. tridentina* (226 y 251) y entre *M. andinensis* (110 y 117) no se presentaron diferencias significativas en cuanto a la producción de biomasa.

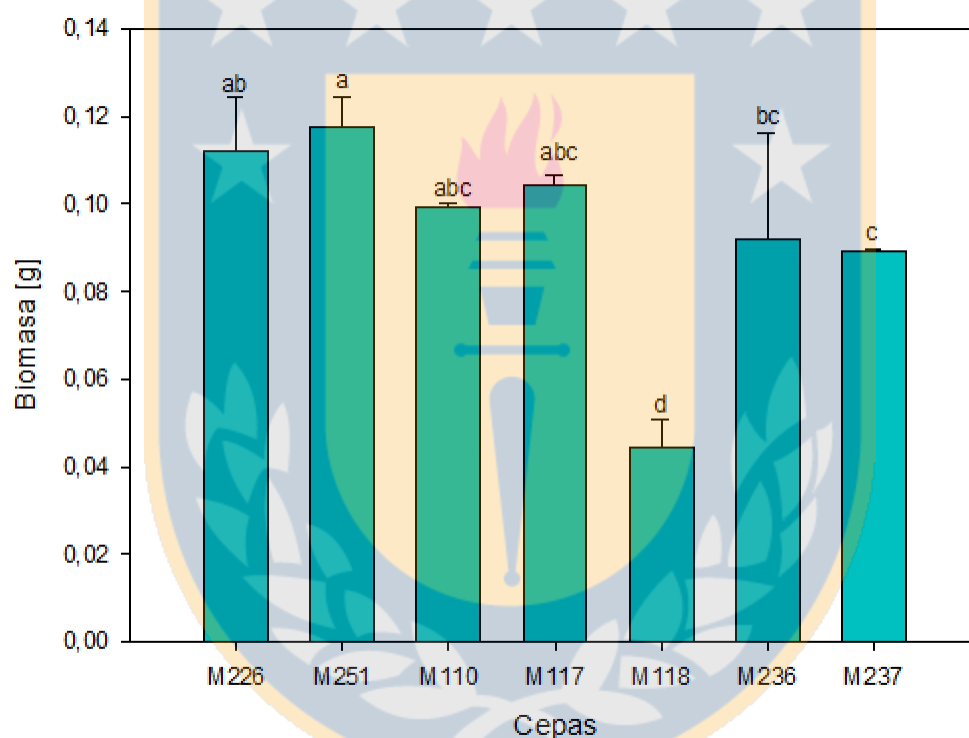


Figura 5. Crecimiento de las cepas de *Morchella* spp. en medio PVK determinado como cantidad de biomasa a los 15 días de incubación. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan).

En cuanto a los cambios de pH producidos por el crecimiento de *Morchella* spp. en el medio PVK líquido, todas las especies mostraron una gran variabilidad respecto al pH inicial (5,8) (Tabla 5). Una disminución de pH fue detectada en los caldos de *M. andinensis* 110, 117 y 118 y *M. eximia*, alcanzándose valores entre 4,3 y 5,2 entre los días 10-15 de incubación. En el caso de las cepas de *M. tridentina*, ambas presentaron un comportamiento diferenciado, disminuyendo a pH 4,4 *M. tridentina* 226 al día 10 o aumentando a pH 6,6 del medio en *M. tridentina* 251. La especie *M. importuna* disminuyó el pH del medio al inicio de la incubación día 5 y 10 a pH 4,9 y 4,1 respectivamente para luego aumentarlo para pH de 6,3 a los 15 días de incubación (Tabla 4).

Tabla 4. Cambios en el pH de los caldos de cultivo producidos por las diferentes cepas de *Morchella* spp. durante diferentes periodos de incubación en medio PVK.

Cepas	Día 5	Día 10	Día 15
226	4,6 ± 0,1	4,4 ± 0,1	5,6 ± 1,5
251	6,0 ± 0,0	5,7 ± 0,0	6,6 ± 0,0
110	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,3	5,2 ± 0,9
117	5,8 ± 0,0	4,8 ± 0,8	4,5 ± 0,2
118	5,6 ± 0,1	4,6 ± 0,3	4,8 ± 0,2
236	5,2 ± 0,5	4,3 ± 0,0	4,9 ± 1,5
237	4,9 ± 0,2	4,1 ± 0,1	6,3 ± 0,3

Los valores corresponden al promedio de 2 réplicas ± DE, medidos a los 5, 10 y 15 días de incubación. El número de las cepas corresponde a las especies señaladas en la Figura 5.

Se determinó la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, en la cual las especies *M. tridentina* 226, *M. andinensis* 118 y *M. eximia* presentaron diferencias significativas en los 3 días, *M. andinensis* 110 y 117 en los días 5 y 10 con respecto al día 15, *M. importuna* en los días 10 y 15 con respecto al día 5 y finalmente *M. tridentina* 251 con diferencias solo en los días 5 y 10. Al analizar todas las especies en el día 15 se determinó que la especie *M. andinensis* 110 fue la que obtuvo mayor

actividad de fosfatasa alcalina, en comparación a todas las demás cepas. El menor valor de fosfatasa alcalina fue obtenido por M251.

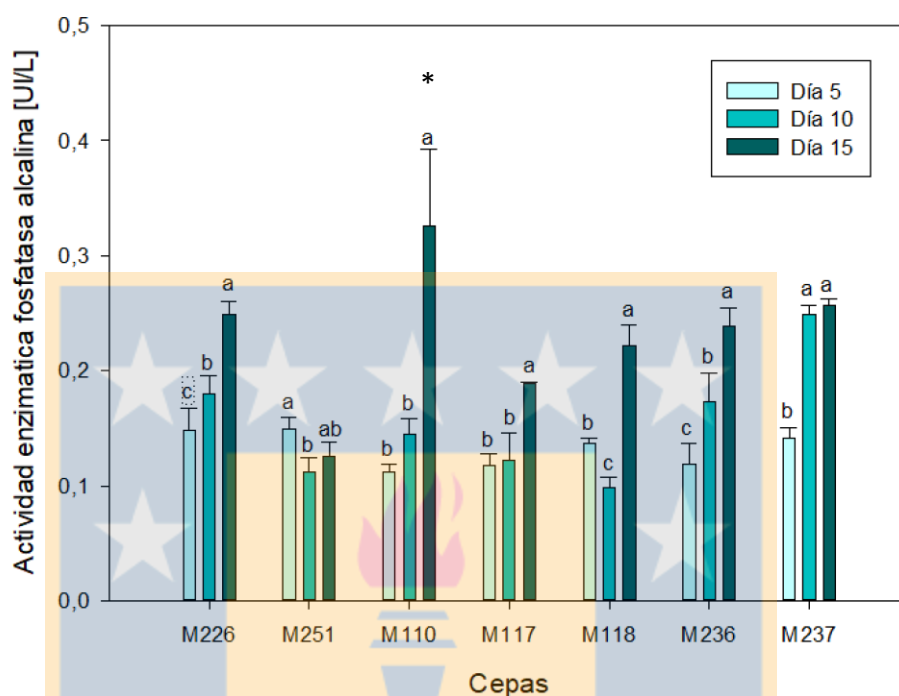


Figura 6. Actividad enzimática fosfatasa alcalina por las diferentes cepas de *Morchella* spp. en diferentes periodos de cultivo en medio PVK líquido. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos (comparado en forma independiente cada especie con los días 5,10 y 15) con un $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). * indica mayor actividad de fosfatasa alcalina, siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas en el día 15.

Al determinar la actividad enzimática de fosfatasa acida, las especies *M. tridentina* 226 y *M. andinensis* 110 presentaron diferencias significativas en los 3 días de medición, *M. andinensis* 117, 118 y *M. tridentina* 251 presentaron diferencias entre el día 5 y 15 con respecto al día 10 y finalmente *M. importuna* el cual sólo presentó diferencias en los días 5 y 10.

Al comparar la producción de fosfatasa ácida de las diferentes cepas de *Morchella* a los 15 días se evidenció que *M. eximia* 236 presentó la mayor concentración de fosfatasa ácida 0,595 UI/L con respecto al resto de las cepas seguido de *M. tridentina* 226 y *M. importuna* 237, estas dos últimas no presentaron diferencias entre ellas, pero si con el resto de las cepas evaluadas. El resto de las cepas *M. tridentina* 251, *M. andinensis* 110, 117 y 118 no presentaron diferencias significativas entre ellas.

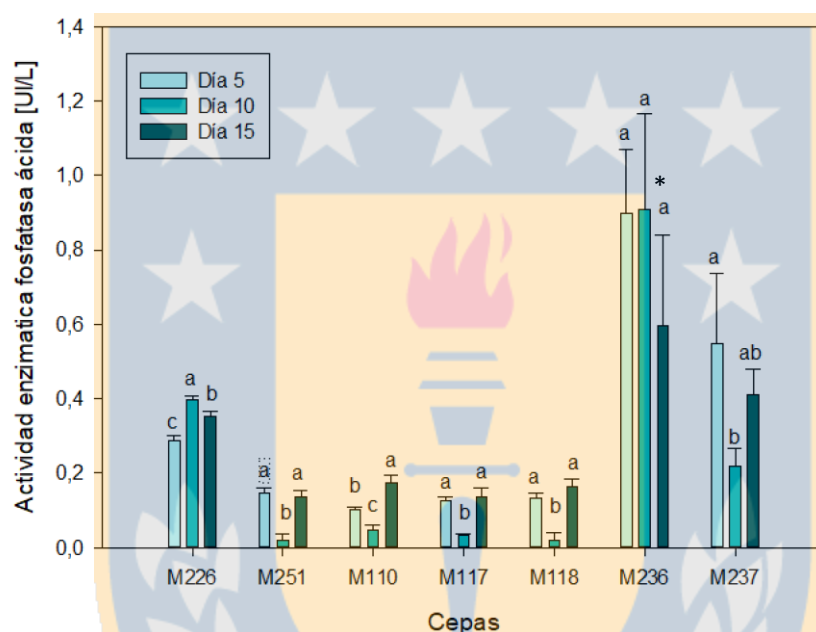


Figura 7. Actividad enzimática fosfatasa ácida por las diferentes cepas de *Morchella* spp. en diferentes periodos de cultivo en medio PVK líquido. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos (comparado en forma independiente cada especie con los días 5,10 y 15) con un $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). * indica mayor actividad de fosfatasa ácida, siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas en el día 15.

6.3 Determinación de auxinas (AIA)

Para la producción de AIA en las diferentes especies, se logró determinar que las especie *M. tridentina* 251 presento diferencias significativas en los 3 días de medición, *M. andinensis* 110, 117, 118 y *M. importuna*, en los días 5 y 10 con respecto al día 15, y finalmente *M. tridentina* 226 en el día 5 con respecto a los días 10 y 15. Todas las especies evaluadas mostraron a través del tiempo un aumento en la producción de auxinas, siendo en el día 15 su mayor concentración. Al comparar la producción de AIA entre las diferentes cepas al día 15 se evidenció que *M. importuna* 237 presento la mayor producción de AIA, siendo estas diferencias significativas respecto a todas las otras cepas evaluadas, seguido de M226 (Figura 8). Cabe destacar que M236, M110 y M118 presentaron los menores valores de AIA.

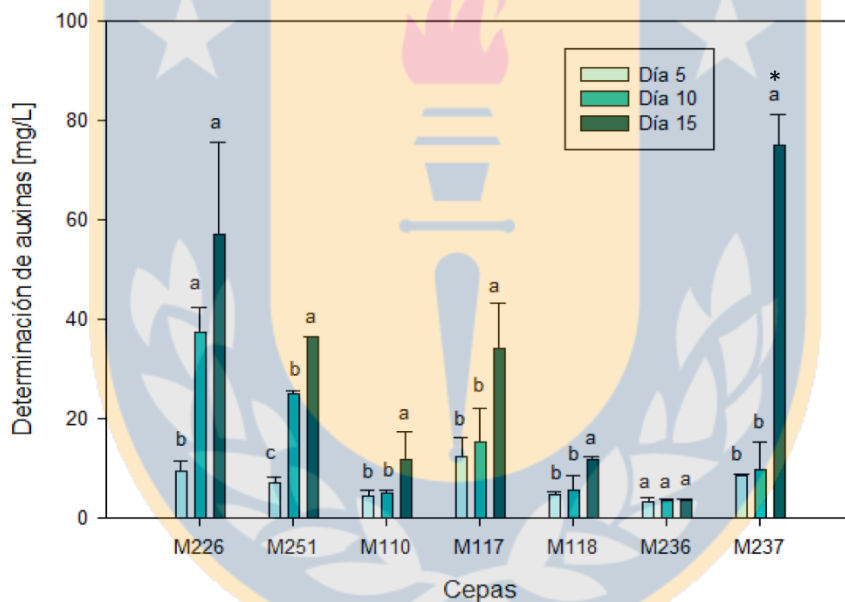


Figura 8. Determinación de auxinas (AIA) de las diferentes cepas de *Morchella* spp. evaluadas en diferentes tiempos de cultivo en medio PD. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos (comparado en forma independiente cada especie con los días 5,10 y 15) con un $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan). * indica mayor determinación de auxinas, siendo estas diferencias significativas con todas las otras cepas en el día 15.

Al finalizar los 15 días, todas las especies mostraron crecimiento de biomasa, *M. tridentina* 226 y *M. andinensis* 117 presentaron los mayores valores (0,03 g y 0,02 g respectivamente) no presentando diferencias significativas entre ellas, pero si con el resto de las especies evaluadas. Para *M. importuna* 237 no se observó diferencias con *M. andinensis* 118 ni con *M. tridentina* 251, pero si con el resto de las cepas. En cambio, la especie *M. eximia* 236 fue quien presentó el menor valor de biomasa 0,01 g presentando diferencia significativa respecto al resto de las cepas estudiadas, excepto con la cepa 110 (Figura 9).

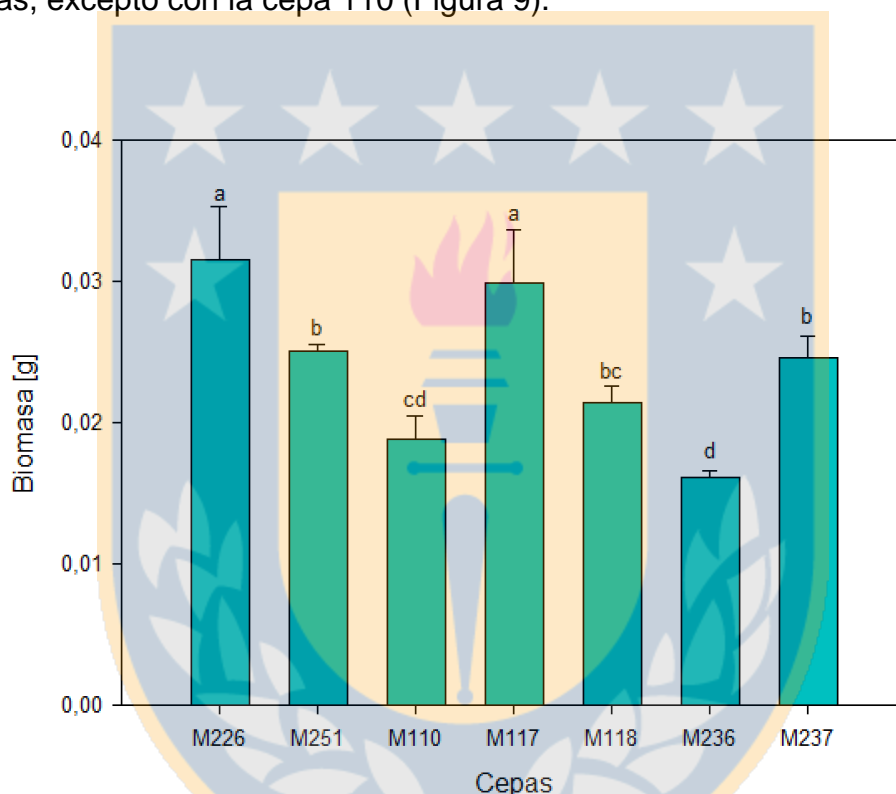


Figura 9. Crecimiento de las cepas de *Morchella* spp. en medio PD. determinado como cantidad de biomasa a los 15 días de incubación. Las especies corresponden a *M. tridentina* (226 y 251), *M. andinensis* (110, 117 y 118), *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237). Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan).

6.4 Biomasa aérea y radicular en plantas de *N. tabacum*

Los resultados obtenidos para biomasa aérea (BA) y radicular (BR) indicaron que todas las cepas inoculadas generaron una estimulación de la BA y BR, presentando diferencias significativas entre ellas, excepto *M. tridentina* 226, que no presentó diferencias significativas en la biomasa radicular con respecto al control. En la evaluación aérea y radicular la cepa *M. importuna* 237 fue la que obtuvo una mayor biomasa 28,85 y 10 mg (BA y BR, respectivamente), presentando diferencias significativas respecto al resto de las cepas evaluadas y el control.

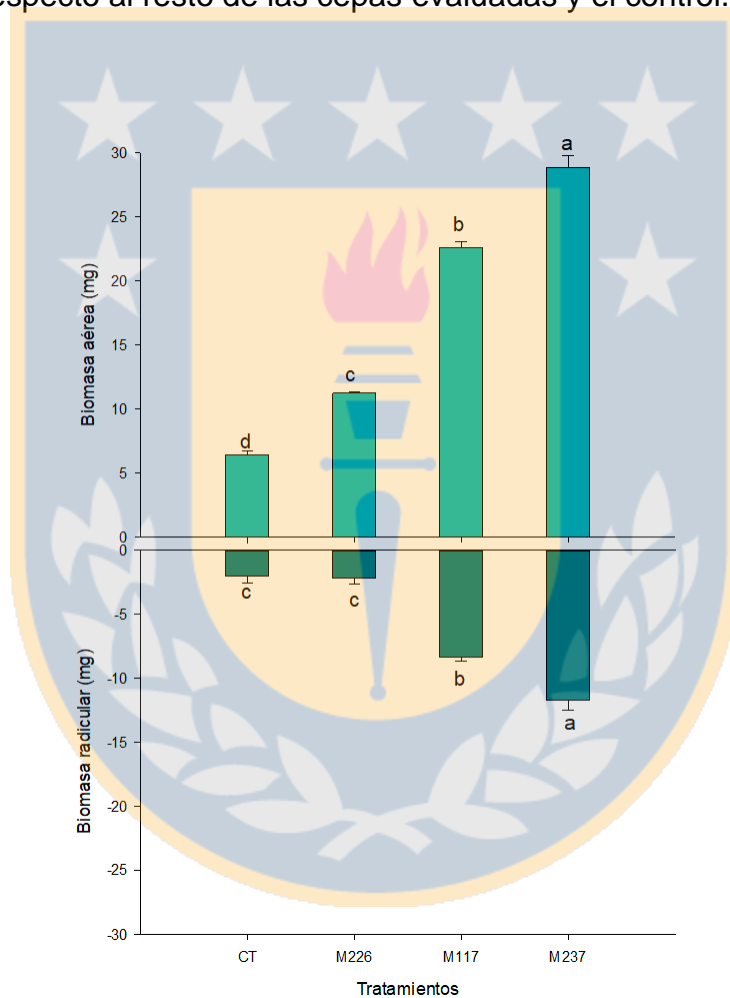


Figura 10. Biomasa aérea y radicular de las plantas de *N. tabacum* inoculadas con especies de *M. andinensis* 117, *M. tridentina* 226 y *M. importuna* 237. Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0,05$ (ANOVA, test Duncan).

Tabla 5. Determinación del largo radicular (cm) de plántulas de *N. tabacum* tratadas con *Morchella* spp.

Tratamiento	Largo radicular (cm)
Control	6,1 ± 0,6
<i>M. tridentina</i> 226	2,6 ± 0,5
<i>M. andinensis</i> 117	5,6 ± 0,4
<i>M. importuna</i> 237	6,0 ± 0,5

Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas ± DE.

Finalmente se realizó un análisis de componentes principales. Se obtuvieron dos componentes, la primera componente explica un 66,3 % de la variabilidad encontrada y la segunda un 21,8 %, explicando ambos componentes un 88,1 % de la variabilidad de los datos. Las cepas de *M. importuna* (M237) y *M. andinensis* (M117) fueron quienes estimularon una mayor producción de biomasa aérea y radicular en las plantas de *N. tabacum* (Figura 11 y 13). Las cepas de *M. tridentina* M226 generó una mayor producción de sideróforos, biomasa fúngica, y fosfatasa ácida y alcalina. Las plantas controles presentaron un mayor largo radicular.

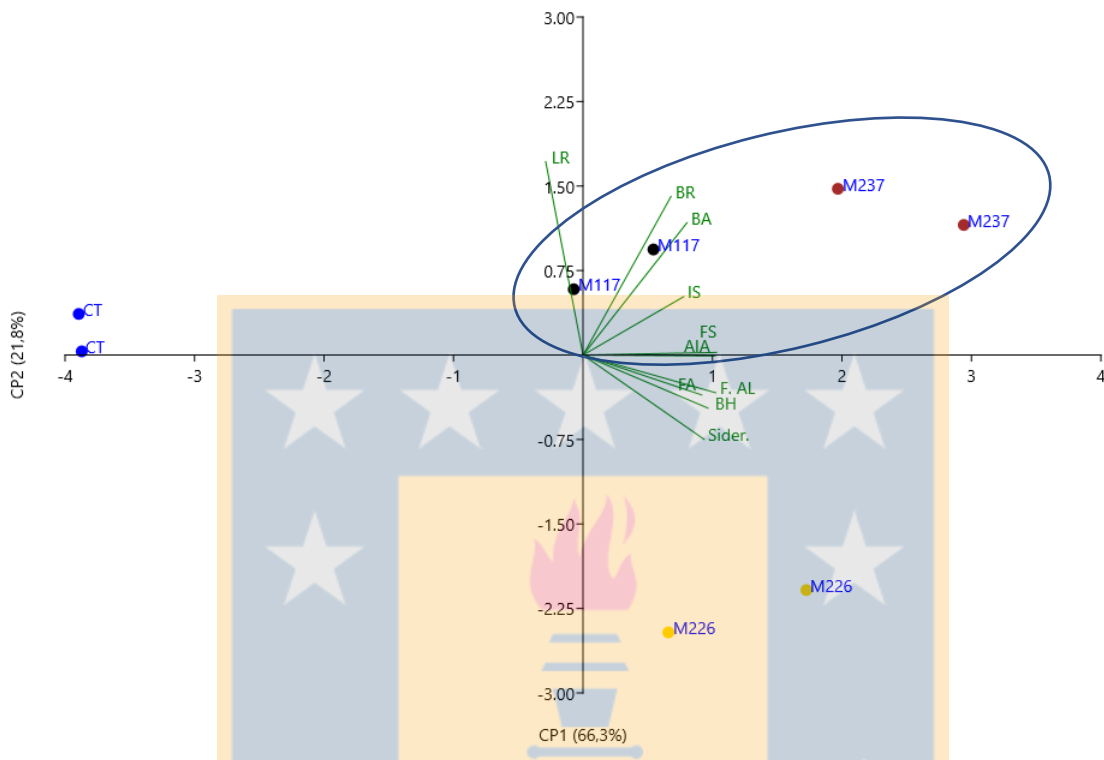


Figura 11. Análisis de componentes principales de *M. tridentina* 226, *M. andinensis* 117 y *M. importuna* 237, en la estimulación del crecimiento de *N. tabacum* como planta modelo. Se utilizaron las siguientes variables: Sider (% sideróforos), FS (fosfato soluble (ug/mL), FA (fosfatasa ácida μ moles/min), F.AL (Fosfatasa alcalina μ moles/min), AIA (ácido indol acético), BH (biomasa hongo g), BA (biomasa aérea mg) y BR (biomasa radicular mg), LR (largo raíz cm), IS (índice de solubilización).

Del análisis de correlación se destaca una correlación positiva entre la fosfatasa ácida (FA) con la auxina (AIA); biomasa aérea (BA) con biomasa radicular (BR); sideróforo (Sider) con fosfato soluble (FS), fosfatasa ácida (FA), fosfatasa alcalina (F. Al), auxina (AIA) y biomasa del hongo (BH); fosfatasa alcalina (F. Al) con la auxina AIA y la biomasa del hongo (BH). Finalmente se destaca una correlación negativa entre la biomasa del hongo (BH) y el largo de raíz (LR), relacionándose con los resultados obtenidos para la cepa M226 (Figura 13).

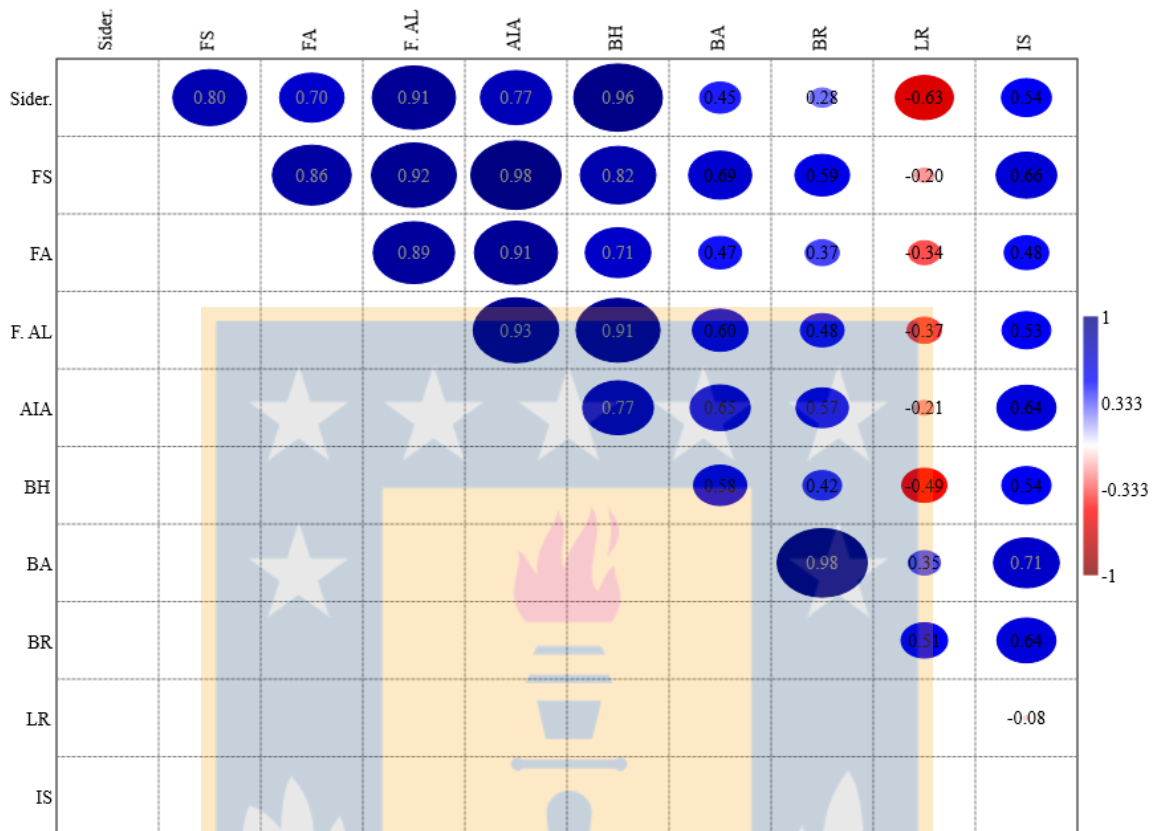


Figura 12. Gráfica de correlación entre las diferentes variables analizadas. Sider (% sideróforos), FS (fosfato soluble (ug/mL), FA (fosfatasa ácida μ moles/min), F.AL (Fosfatasa alcalina μ moles/min), AIA (ácido indol acético), BH (biomasa hongo g), BA (biomasa aérea mg) y BR (biomasa radicular mg), LR (largo raíz cm), IS (índice de solubilización).

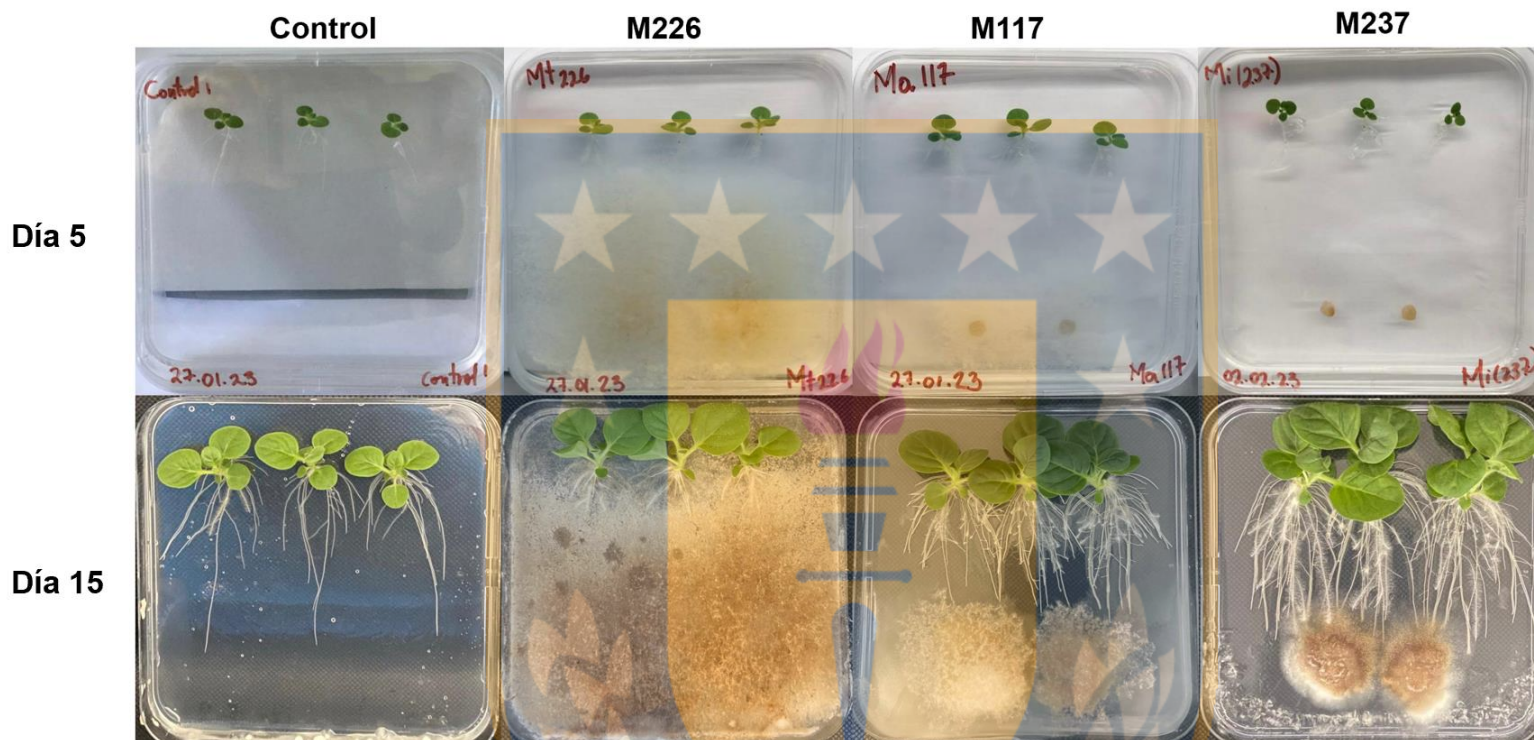


Figura 13. Crecimiento de *N. tabacum* a los 5 y 15 días de ser inoculadas con *M. tridentina* 226, *M. andinensis* 117 y *M. importuna* 237, respecto a las plantas control sin inocular.

VII. Discusión

Entre las propiedades promotoras del crecimiento vegetal que presentan algunos hongos y bacterias destacan la producción de sideróforos, solubilización de fosfato, producción de enzimas y de auxinas, entre otras (Etesami & Glick, 2020) En este trabajo todas las cepas de *Morchella* evaluadas tanto en medio sólido como en medio líquido (EM), crecieron y presentaron reacción CAS positiva para la producción de sideróforos, dependiendo de la cepa y del tiempo de reacción (7-8 días las más rápidas). Todo indicó que el extracto de malta como medio de cultivo es óptimo para el crecimiento de las especies de *Morchella* y favorece el crecimiento de una amplia gama de taxones fúngicos y que los resultados podrían deberse a una variabilidad interespecífica como intraespecífica en la producción de los agentes quelantes (Evangelista et al., 2021). Es conocido que el Fe es un elemento esencial para todos los microorganismos (Murakami et al., 2021), por ende, los sideróforos desempeñan un papel esencial en el acceso al Fe desde el medio ambiente. En otra investigación realizada por Patel et al. (2017) se aislaron dos especies de hongos del género *Aspergillus* (*A. niger* y *A. parasiticus*) para determinar la producción de sideróforos en medio agar-CAS, en donde se observó un aumento en el crecimiento y en la producción, verificado por el cambio de coloración del medio. Posteriormente, se determinó en medio líquido la producción de sideróforos de forma cuantitativa, dando como resultado que *A. niger* produjo un 80% y *A. parasiticus* un 73% de unidades de sideróforos. Esta investigación realizada por los autores se llevó a estudios en macetas para ver el efecto de los inóculos en plantas de frijol, ambos inóculos fúngicos aislados mostraron un aumento en el número de hojas, ramas y raíces laterales, altura de la planta, peso fresco y peso seco en comparación con el control, demostrándose con estos resultados que ambos aislados fúngicos productores de sideróforos podrían ser bioinoculantes potenciales para mejorar el crecimiento de la planta de frijol mungo (Patel et al., 2017).

Al evaluar la solubilización de fosfato de las diferentes especies/cepas de *Morchella*, se observó que en medio sólido las especies *M. tridentina* 226 y 251, junto con *M.*

eximia 236 no presentaron halo de solubilización en comparación a las demás especies, estas especies podrían haber reciclado y utilizado las pequeñas cantidades de P disponibles del mismo inóculo, y esto podría haber sostenido el crecimiento del micelio durante un tiempo (Ceci et al., 2018). Al evaluar las mismas cepas en medio líquido, se observó que todas las especies mostraron solubilización de fosfato, siendo la especie *M. eximia* 236 la que presentó la mayor capacidad de solubilización. El hecho de que algunos aislados fúngicos no exhibieran halo de solubilización en medio sólido después de ser reactivados, se debe a que la confiabilidad de la técnica basada en el criterio de halo de solubilización es cuestionable, ya que algunos aislados que no producen halo en placas de agar pueden solubilizar varios tipos de fosfatos insolubles en medio líquido (Beltrán Pineda, 2015). Nautiyal (1999), comprobó que el método cuantitativo es más sensible y por eso es recomendable a la hora de evaluar cualquier microorganismo con potencial de solubilizar P.

En una investigación realizada por Bononi et al. (2020), se utilizaron cepas de *Trichoderma* de la selva amazónica capaces de solubilizar/mineralizar fosfato del suelo y promover el crecimiento de la soja, en donde los resultados obtenidos revelaron el potencial de la especie como prometedores agentes biofertilizantes, ya que dentro de los resultados se obtuvo que el 19,5% de las cepas de *Trichoderma* aisladas pudieron solubilizar fosfato y además de mostraron respuestas positivas en la promoción del crecimiento de la soja del 2,1% al 41,1%, así como en la eficiencia de absorción de P hasta el 141% (Bononi et al., 2020). En otra investigación realizada por Omar (1998), se probaron 36 especies de hongos aisladas del suelo para determinar su capacidad de solubilizar roca fosfórica en placas de agar, en donde la mayoría de ellos no eran solubilizadores de fosfato de roca, pero dos de ellos (*Aspergillus niger* y *Penicillium citrinum*) tenían una actividad alta para solubilizar. En medio líquido, *A. niger* y *P. citrinum*, causaron una disminución en el pH de los medios de cultivo y solubiliaron cantidades considerables de fosfato.

El pH del medio de cultivo influye directamente en el crecimiento de los microorganismos y en los procesos bioquímicos que realizan (Marra et al., 2015). Los valores de pH en el ensayo de medio líquido presentaron una disminución en todas las cepas de *Morchella* en el día 10. La disminución del pH indica claramente la producción de ácidos orgánicos y fosfatasas, que se consideran responsables de la solubilización del fósforo. Se ha sugerido que los microorganismos que disminuyen el pH del medio durante el crecimiento son solubilizadores eficientes de fósforo (Khan et al., 2006).

Otra vía crucial para el reciclaje de P por los hongos es la liberación de fosfatasas ácidas (que actúan a pH ácido) y alcalinas (que actúan a pH básico) (Corrales Ramírez et al., 2014b). Estas enzimas degradan los compuestos orgánicos del fósforo del suelo y, por lo tanto, aumentan la biodisponibilidad del P para las plantas y los microorganismos (Rengel, 2008). La mayor producción de fosfatasa alcalina se presentó en *M. andinensis* 110, lo cual podría estar asociado a que crece típicamente dentro de bosques umbríos, muy cerca de *Nothofagus* y también cerca de troncos de árboles podridos; con menor frecuencia, se registraron especímenes de bordes de bosques o pastizales abiertos, sobre suelo franco arenoso neutro o ligeramente ácido (Sanz-Rocha et al., 2023). En relación a la fosfatasa ácida se observó que *M. eximia* 236 y *M. importuna* 237, presentaron las mayores actividades indicando 0,595 y 0,410 UI/L, respectivamente, lo cual se debe a que la producción de fosfatasas ácidas por los hongos se regula a nivel genético en respuesta a la disponibilidad de P en el ambiente, como un mecanismo importante para la supervivencia en condiciones de escasez de P y para la colonización de tejidos huéspedes durante la infección. Es conocido que *M. importuna*, tiene una fitasa enzimática de la familia de la fosfatasa ácida de histidina identificada por Tan et al. (2017). Las fitasas son enzimas hidrolíticas que pueden degradar el fitato y liberar fósforo inorgánico, la cual es una forma más fácilmente disponible de P para las plantas, mejorando su crecimiento y desarrollo (Singh et al., 2020). En general en la literatura se ha afirmado que los hongos micorrízicos arbusculares poseen una mayor actividad de fosfatasas alcalinas en comparación con otros hongos y

bacterias, lo cual podría estar determinado por la relación simbiótica de estos organismos con su hospedero (Etesami et al., 2021).

El AIA es la principal auxina en las plantas, regula los procesos de crecimiento y desarrollo, como la división y elongación celular, la diferenciación de tejidos, la dominancia apical y las respuestas a la luz, la gravedad y los patógenos (Fu et al., 2015b). Al determinar la producción de auxinas, revelo que todas las especies aumentaban a través del tiempo, destacándose *M. importuna* 237, *M. tridentina* 226 y *M. andinensis* 117. El AIA producido por hongos está relacionado con inducir la formación de raíces laterales y el desarrollo de los pelos radiculares. La promoción del crecimiento y desarrollo de las raíces provoca una mayor absorción de nutrientes por parte de las plantas asociadas (Sun et al., 2014), esto se pudo observar en el caso del tratamiento de *N. tabacum* con las especies *M. andinensis*, *M. tridentina* y *M. importuna* (Figuras 10 y 12), donde se observó una mayor biomasa seca tanto aérea como radicular, respecto a las plantas control. Según las investigaciones realizadas por Phanpadith et al. (2020) y Yu et al. (2016b), se estudió la planta de maíz inoculada con la especie *Morchella crassipes*, observándose una estimulación en el desarrollo del sistema radicular, un aumento significativo en la biomasa de raíces y reducción de la incidencia *Fusarium verticillioides*, en donde el posible responsable de la estimulación del crecimiento celular mediada por *M. crassipes* podría ser la producción de AIA.

Finalmente, al realizar el análisis de componentes principales en el ensayo con la planta modelo *N. tabacum*, se observó claramente que *M. importuna* 237 y *M. andinensis* 117 son las cepas que generaron una mayor producción de biomasa aérea y radicular en las plantas, correlacionándose con una mayor producción de AIA, fosfato soluble y mayor índice de solubilización, no observándose esa tendencia en *M. tridentina* 226 (biomasa radicular). Probablemente, el efecto neutro de *M. tridentina* 226 se debe a que, a pesar de producir sideróforos, tener actividad de fosfatasa y ser productora de AIA, su crecimiento fue excesivamente rápido (Figura 13, día 5), lo cual generó una limitante para el desarrollo radicular en el periodo de tiempo que duró el ensayo.

VIII. Conclusiones

- Todas las especies de *Morchella* presentaron producción de sideróforos, tanto en medio líquido como sólido, lo cual las convierte en especies con potencial de solubilizar y quelar hierro.
- Todas las especies de *Morchella* presentaron en mayor o menor medida solubilización de fosfato en medio líquido, destacando *M. eximia* 236 seguida de *M. importuna* 237, con una concentración de fosfato soluble de 40,85 µg/mL para la cepa 236 y 35,08 µg/mL para la cepa 237, en el día 15.
- La actividad de fosfatasa (ácidas y alcalinas) presentes en *Morchella* spp. fue distinta para todas las especies, siendo la mayor actividad de fosfatasa ácida producida por *M. eximia* 236 y la de fosfatasa alcalina producida por *M. andinensis* 110.
- La fitohormona AIA se determinó en todas las especies de *Morchella*, destacando *M. importuna* 237 (75,09 mg/L), seguida por *M. tridentina* 226 (57,01mg/L) y *M. andinensis* 117 (34,11mg/L), las cuales estimularon el crecimiento tanto aéreo como radicular en las plantas de *N. tabacum*, principalmente *M. importuna*.
- Finalmente, se rechaza la hipótesis planteada en este estudio dado que especies provenientes de plantaciones forestales como *M. importuna* 237 tuvo mayor efecto en la estimulación del crecimiento vegetal, comparada con especies provenientes de bosque nativo como *M. tridentina* 226 y *M. andinensis* 117. Sin embargo, nuevos estudios son necesarios para evaluar el efecto que pudiesen tener estos aislados en la estimulación del crecimiento de otras especies vegetales.

Bibliografía

- Acuña J, Jorquera MA, Martínez OA, Menezes-Blackburn D, Fernández MT, Marschner P, Greiner R, & Mora ML. (2011). Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Soils, Water and Agricultural Engineering*, 11(3), 1–12.
- Adhikari, P., & Pandey, A. (2019). Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. *Rhizosphere*, 9, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.11.002>
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Argumedo-Delira, R., Gómez-Martínez, M. J., & Mora-Delgado, J. (2022a). Plant Growth Promoting Filamentous Fungi and Their Application in the Fertilization of Pastures for Animal Consumption. *Agronomy*, 12(12), 3033. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123033>
- Argumedo-Delira, R., Gómez-Martínez, M. J., & Mora-Delgado, J. (2022b). Plant Growth Promoting Filamentous Fungi and Their Application in the Fertilization of Pastures for Animal Consumption. *Agronomy*, 12(12), 3033. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123033>
- Baroni, T. J., Beug, M. W., Cantrell, S. A., Clements, T. A., Iturriaga, T., Læssøe, T., Holgado Rojas, M. E., Aguilar, F. M., Quispe, M. O., Lodge, D. J., & O'Donnell, K. (2018). Four new species of *Morchella* from the Americas. *Mycologia*, 110(6), 1205–1221. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1533772>
- Baynes, M., Newcombe, G., Dixon, L., Castlebury, L., & O'Donnell, K. (2012). A novel plant–fungal mutualism associated with fire. *Fungal Biology*, 116(1), 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.10.008>
- Beltrán Pineda, M. E. (2015). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa (*Solanum tuberosum*). *CIENCIA EN DESARROLLO*, 5(2). <https://doi.org/10.19053/01217488.3669>
- Bononi, L., Chiaramonte, J. B., Pansa, C. C., Moitinho, M. A., & Melo, I. S. (2020). Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Scientific Reports*, 10(1), 2858. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8>

- Ceci, A., Pinzari, F., Russo, F., Maggi, O., & Persiani, A. M. (2018). Saprotrophic soil fungi to improve phosphorus solubilisation and release: In vitro abilities of several species. *Ambio*, 47(S1), 30–40. <https://doi.org/10.1007/s13280-017-0972-0>
- Chávez, D., Machuca, Á., Fuentes-Ramirez, A., Fernandez, N., & Cornejo, P. (2020). Shifts in soil traits and arbuscular mycorrhizal symbiosis represent the conservation status of *Araucaria araucana* forests and the effects after fire events. *Forest Ecology and Management*, 458, 117806. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117806>
- Chung Guin-po, P. (2005). *Guía de campo principales hongos micorrícicos comestibles y no comestibles presentes en Chile*. INFOR. <https://doi.org/10.52904/20.500.12220/4586>
- Corrales Ramírez, Ms. L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014a). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 67. <https://doi.org/10.22490/24629448.997>
- Corrales Ramírez, Ms. L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014b). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 67. <https://doi.org/10.22490/24629448.997>
- Correa, C., & Martinez, A. (2013). Información Tecnológica De Productos Forestales No Madereros Del Bosque Nativo En Chile. In *Antecedentes Silvícolas y Tecnológicos de Morchella sp. St. Amans (M. conica, M. esculenta, M. spp)*.
- Dahlstrom, J. L., Smith, J. E., & Weber, N. S. (2000). Mycorrhiza-like interaction by *Morchella* with species of the Pinaceae in pure culture synthesis Mention of trade or firm names does not constitute an endorsement by the US Department of Agriculture. In *Mycorrhiza* (Vol. 9). Springer-Verlag.
- Domka, A. M., Rozpaadek, P., & Turnau, K. (2019a). Are Fungal Endophytes Merely Mycorrhizal Copycats? The Role of Fungal Endophytes in the Adaptation of Plants to Metal Toxicity. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00371>
- Domka, A. M., Rozpaadek, P., & Turnau, K. (2019b). Are Fungal Endophytes Merely Mycorrhizal Copycats? The Role of Fungal Endophytes in the Adaptation of Plants to Metal Toxicity. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00371>

- Du, X.-H., Zhao, Q., & Yang, Z. L. (2015). A review on research advances, issues, and perspectives of morels. *Mycology*, 6(2), 78–85. <https://doi.org/10.1080/21501203.2015.1016561>
- Emenecker, R. J., & Strader, L. C. (2020). Auxin-Abscisic Acid Interactions in Plant Growth and Development. *Biomolecules*, 10(2), 281. <https://doi.org/10.3390/biom10020281>
- Etesami, H., & Glick, B. R. (2020). Halotolerant plant growth–promoting bacteria: Prospects for alleviating salinity stress in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 178, 104124. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104124>
- Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2021). Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Phosphate–Solubilizing Bacteria, and Silicon to P Uptake by Plant. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699618>
- Evangelista, F. R., Chairez, I., Sierra, S., Leal Lara, H., Martínez-González, C. R., Garín Aguilar, M. E., & Valencia del Toro, G. (2021). A novel coconut-malt extract medium increases growth rate of morels in pure culture. *AMB Express*, 11(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01325-2>
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F. A., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., Ullah, N., Faiq, M., Khan, M. R., Tareen, A. K., Khan, A., Ullah, A., Ullah, N., & Huang, J. (2015). Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*, 75(2), 391–404. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-0013-y>
- Fu, S.-F., Wei, J.-Y., Chen, H.-W., Liu, Y.-Y., Lu, H.-Y., & Chou, J.-Y. (2015a). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling & Behavior*, 10(8), e1048052. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Fu, S.-F., Wei, J.-Y., Chen, H.-W., Liu, Y.-Y., Lu, H.-Y., & Chou, J.-Y. (2015b). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling & Behavior*, 10(8), e1048052. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). COLORIMETRIC ESTIMATION OF INDOLEACETIC ACID. *Plant Physiology*, 26(1), 192–195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>

- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>
- Himpsl, S. D., & Mobley, H. L. T. (2019). *Siderophore Detection Using Chrome Azurol S and Cross-Feeding Assays* (pp. 97–108). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9601-8_10
- Hobbie, E. A., Rice, S. F., Weber, N. S., & Smith, J. E. (2016). Isotopic evidence indicates saprotrophy in post-fire *Morchella* in Oregon and Alaska. *Mycologia*, 108(4), 638–645. <https://doi.org/10.3852/15-281>
- Jarosch, K. A., Doolette, A. L., Smernik, R. J., Tamburini, F., Frossard, E., & Bünemann, E. K. (2015). Characterisation of soil organic phosphorus in NaOH-EDTA extracts: A comparison of ³¹P NMR spectroscopy and enzyme addition assays. *Soil Biology and Biochemistry*, 91, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.010>
- Khan, H., Bhuiyan, M., Monzur, S., & Oki, Y. (2006). Effects of Selected Treatments on the Production of Rice in Acid Sulfate Soils in a Simulation Study. *Jpn J Trop Agric*, 50(3), 109–115.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73–98. <https://doi.org/10.1080/03650340902806469>
- Kumar, R., & Shastri, B. (2017). Role of Phosphate-Solubilising Microorganisms in Sustainable Agricultural Development. In *Agro-Environmental Sustainability* (pp. 271–303). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2_13
- Loizides, M. (2017). Morels: the story so far. *Field Mycology*, 18(2), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.fldmyc.2017.04.004>
- Lucena, J. J., & Hernandez-Apaolaza, L. (2017). Iron nutrition in plants: an overview. *Plant and Soil*, 418(1–2), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3316-8>
- Machuca, A., Gerding, M., Chávez, D., Palfner, G., Oyarzúa, P., Guillén, Y., & Córdova, C. (2021). Two new species of *Morchella* from Nothofagus forests in Northwestern Patagonia (Chile). *Mycological Progress*, 20(6), 781–795. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01703-x>

- Machuca, Á. H., Córdova, C. S., Agrónomo, I., Gómez, C. N., Gerding, M. G., & Silva, F. L. (2013). *Proyecto CONAF 077/2013 Manual de recolección sustentable de Morchella spp. de la patagonia chilena*.
- Maheshwari, D. K., Dheeman, S., & Agarwal, M. (2015). *Phytohormone-Producing PGPR for Sustainable Agriculture* (pp. 159–182). https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_7
- Malhotra, H., Vandana, Sharma, S., & Pandey, R. (2018). Phosphorus Nutrition: Plant Growth in Response to Deficiency and Excess. In *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance* (pp. 171–190). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8_7
- Marra, L. M., Oliveira-Longatti, S. M. de, Soares, C. R. F. S., Lima, J. M. de, Olivares, F. L., & Moreira, F. M. S. (2015). Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 367–375. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246246220131102>
- Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 413–451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>
- Milagres, A. M. F., Machuca, A., & Napoleão, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00028-7)
- Mohamed, E. A. H., Farag, A. G., & Youssef, S. A. (2018). Phosphate Solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* Isolated from Tomato Plant Rhizosphere. *Journal of Environmental Protection*, 09(03), 266–277. <https://doi.org/10.4236/jep.2018.93018>
- Munir, E., Yurnaliza, Lutfia, A., & Hartanto, A. (2022). Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Activity of Endophytic Fungi from Zingiberaceous Species. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 22(1), 149–156. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2022.149.156>
- Murakami, C., Tanaka, A. R., Sato, Y., Kimura, Y., & Morimoto, K. (2021). Easy detection of siderophore production in diluted growth media using an improved

- CAS reagent. *Journal of Microbiological Methods*, 189, 106310. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106310>
- Nacoon, S., Jogloy, S., Riddech, N., Mongkoltharuk, W., Kuyper, T. W., & Boonlue, S. (2020). Interaction between Phosphate Solubilizing Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth Promotion and Tuber Inulin Content of *Helianthus tuberosus* L. *Scientific Reports*, 10(1), 4916. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61846-x>
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). *Role of Phosphatase Enzymes in Soil* (pp. 215–243). https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_9
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- O'Donnell, K., Rooney, A. P., Mills, G. L., Kuo, M., Weber, N. S., & Rehner, S. A. (2011). Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin and high continental endemism and provincialism in the Holarctic. *Fungal Genetics and Biology*, 48(3), 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.09.006>
- Omar, S. A. (1998). The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular–arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 211–218. <https://doi.org/10.1023/A:1008830129262>
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 701–712. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9047>
- Ower, R. (1982). BRIEF ARTICLES NOTES ON THE DEVELOPMENT OF THE MOREL ASCOCARP: MORCHELLA ESCULENTA. In *Mycologia* (Vol. 74, Issue 1).
- Patel, D., Patel, S., Thakar, P., & Saraf, M. (2017). Siderophore Producing *Aspergillus* spp as Bioinoculant for Enhanced Growth of Mung Bean. *International Journal of Advanced Agricultural Science and Technology*, 6(1), 111–120. <https://doi.org/10.23953/cloud.ijaast.229>
- Phanpadith, P., Yu, Z., Yu, D., Phongsavath, S., Shen, K., Zheng, W., & Phommakoun, B. (2020). Promotion of maize growth by a yellow morel,

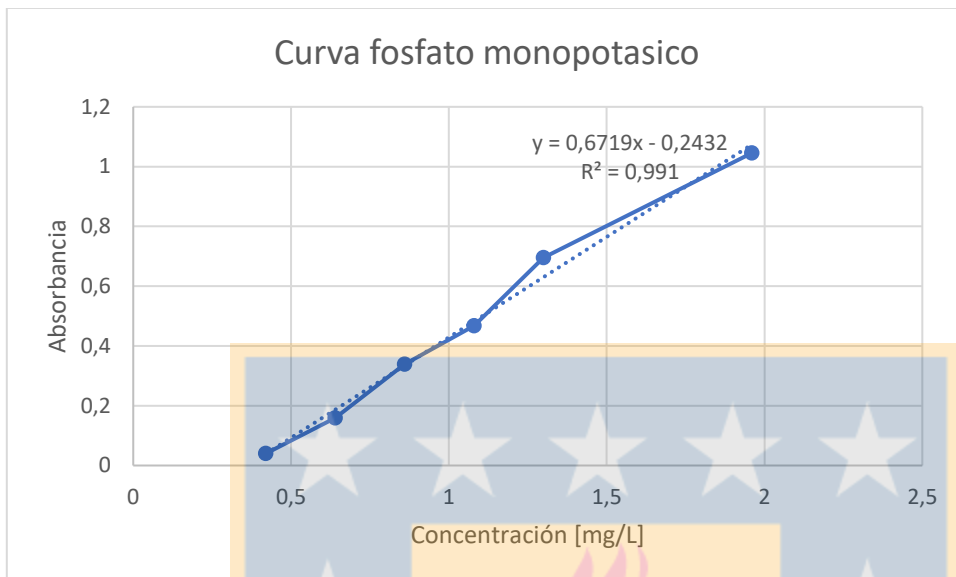
- Morchella crassipes. *Symbiosis*, 80(1), 33–41. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00651-1>
- Rana, K. L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A. N., Yadav, N., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020). Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(8), 1075–1107. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01429-y>
- Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21(1), 49–68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>
- Rengel, Z. (2008). Bioavailability of Phosphorus and Micronutrients in the Soil-Plant-Microbe Continuum. *Revista de La Ciencia Del Suelo y Nutrición Vegetal*, 8(especial). <https://doi.org/10.4067/S0718-27912008000400013>
- Roberts, T. L., & Johnston, A. E. (2015). Phosphorus use efficiency and management in agriculture. *Resources, Conservation and Recycling*, 105, 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.09.013>
- Sadaf, S., Nuzhat, A., & Nasreen, K. (2009). Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *African Journal of Agricultural Research*, 4(11), 1312–1316.
- Sanz-Rocha, M., Gerding, M., Quezada, T., Vargas, M., Chávez, D., & Machuca, Á. (2023). Molecular and cultural characterization of Morchella spp. from disturbed environments of central-southern Chile. *Fungal Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.01.009>
- Scavino, A. F., & Pedraza, R. O. (2013). The Role of Siderophores in Plant Growth-Promoting Bacteria. In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity* (pp. 265–285). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_11
- Schalk, I. J., Hannauer, M., & Braud, A. (2011). New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology*, 13(11), 2844–2854. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- SINGH, B., BOUKHRIS, I., PRAGYA, KUMAR, V., YADAV, A. N., FARHAT-KHEMAKHEM, A., KUMAR, A., SINGH, D., BLIBECH, M., CHOUAYEKH, H., & ALGHAMDI, O. A. (2020). Contribution of microbial phytases to the improvement of plant growth and nutrition: A review. *Pedosphere*, 30(3), 295–313. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60010-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60010-8)
- Snabl, M., Guidori, U., Gianchino, C., Iotti, M., & Zambonelli, A. (2019). Morels on the sand dunes of the Emilia-Romagna coast (Northwestern Adriatic Sea, Italy). *Italian Journal of Mycology*, 48, 16–25. <https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/9374>
- Sun, P.-F., Fang, W.-T., Shin, L.-Y., Wei, J.-Y., Fu, S.-F., & Chou, J.-Y. (2014). Indole-3-Acetic Acid-Producing Yeasts in the Phyllosphere of the Carnivorous Plant *Drosera indica* L. — *PLoS ONE*, 9(12), e114196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114196>
- T. Hernández-Leal, G. Carrión, & G. Heredia. (2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, 45(8), 881–892.
- Tan, H., Tang, J., Li, X., Liu, T., Miao, R., Huang, Z., Wang, Y., Gan, B., & Peng, W. (2017). Biochemical Characterization of a Psychrophilic Phytase from an Artificially Cultivable Morel *Morchella importuna*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2180–2189. <https://doi.org/10.4014/jmb.1708.08007>
- Uitzil-Colli, M. O., & Guzmán-Dávalos, L. (2019). El género *Morchella* (Pezizales: Ascomycota) en Jalisco. *Scientia Fungorum*, 49, e1209. <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1209>
- Vassileva, M., Mendes, G., Deriu, M., Benedetto, G., Flor-Peregrin, E., Mocali, S., Martos, V., & Vassilev, N. (2022). Fungi, P-Solubilization, and Plant Nutrition. *Microorganisms*, 10(9), 1716. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091716>
- Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.-M., Kim, Y.-H., & Lee, I.-J. (2012). Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. *Molecules*, 17(9), 10754–10773. <https://doi.org/10.3390/molecules170910754>

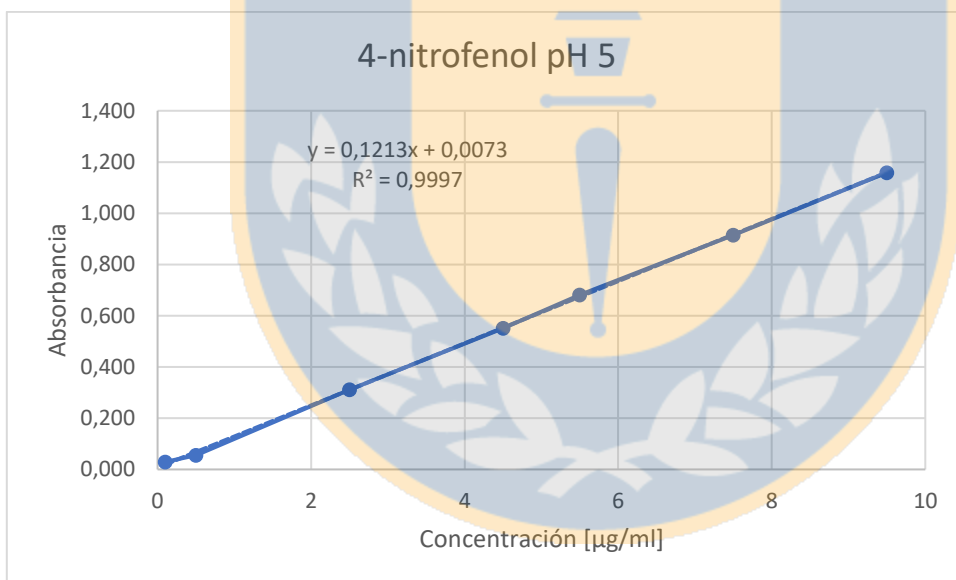
- Yu, D., Bu, F., Hou, J., Kang, Y., & Yu, Z. (2016a). A more improved growth and suppressed Fusarium infection in sweet corn. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(12), 192. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2151-z>
- Yu, D., Bu, F., Hou, J., Kang, Y., & Yu, Z. (2016b). A more improved growth and suppressed Fusarium infection in sweet corn. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(12), 192. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2151-z>
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., & Chua, N.-H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>



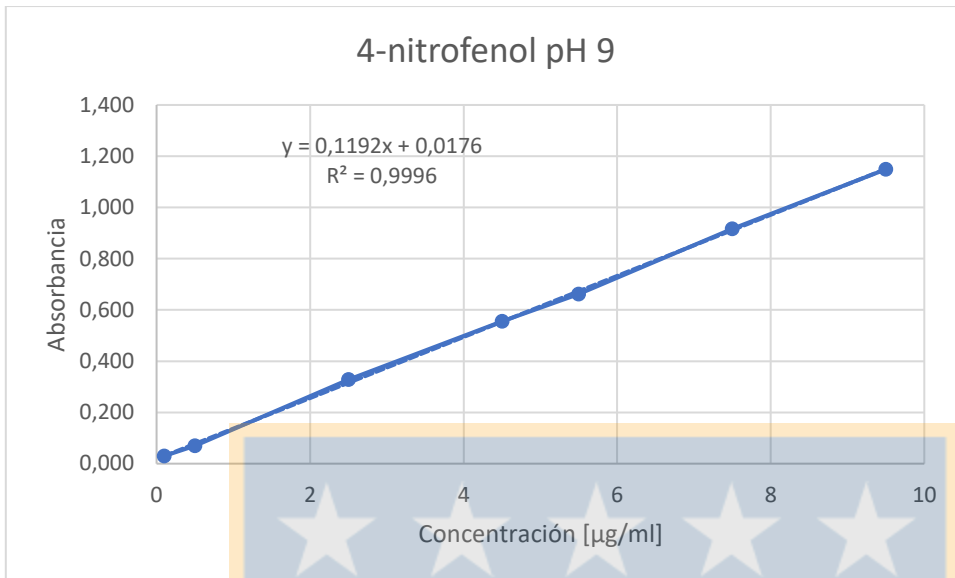
Anexos



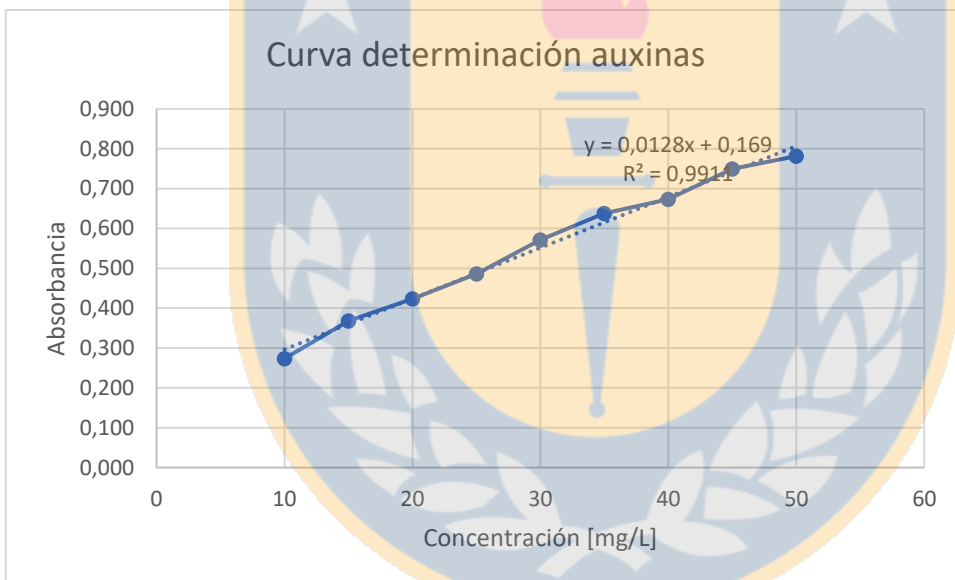
Anexo 1. Curva de calibración para fosfato soluble



Anexo 2. Curva de calibración p-nitrofenol pH5



Anexo 3. Curva de calibración p-nitrofenol pH9



Anexo 4. Curva de calibración determinación de auxinas