

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL



CO-CULTIVO FÚNGICO DE ESPECIES DE *MORCHELLA* Y *UMBELOPSIS* PARA
LA GENERACION DE FITOHORMONAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO
VEGETAL

MEMORIA DE TITULO PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

CAROLINA DÍAZ VALENZUELA
LOS ÁNGELES- CHILE

2025

“Co-cultivo fúngico de especies de *Morchella* y *Umbelopsis* para la generación de fitohormonas promotoras del crecimiento vegetal”

Alumna

Carolina Monserrat Díaz Valenzuela

Ingeniería en Biotecnología Vegetal

Profesor Guía

Dr. Daniel Eduardo Chávez Matamala

Profesor Asociado

Ingeniero Forestal

Jefe de Carrera

Pedro Quiroz Hernández

Profesor instructor

Ingeniero (E) Forestal

Director de Departamento

Dr. Mauricio J. Rondanelli Reyes

Profesor Asociado

Biólogo

Agradecimientos

Finalizando este proceso universitario me gustaría agradecer a mis padres Jimena Valenzuela y Lorenzo Díaz por confiar siempre en mí, motivarme a seguir mis sueños y enseñarme con cariño de que soy capaz de hacer todo lo que me proponga.

A mis hermanos Ignacio y Paulina que siempre están para apoyarme y entregarme la confianza de que no importa lo que pase, siempre estarán conmigo.

A mis sobrinos Mateo, Francisca, Lucas y Rafita que con sus risas, ternura y amor me mostraron que, aunque nunca entendieron que estudiaba y pensaron que “hacia pelear hongos” confían de que soy la mejor científica, doctora de plantas, jardinera, señora de las plantas, etc

A Francisco Cuevas por todo el amor, paciencia y apoyo durante este proceso gracias por siempre estar presente y pendiente de hacer nuestros días más felices..

Además, agradecer al Ingeniero en Biotecnología Vegetal Sr. Christian Deramond por motivarme todos los días, enseñarme que los problemas se solucionan y que se agrega ácido al agua. También agradecerle a mi profesor guía el Dr. Daniel Chávez por la paciencia, incentivar la curiosidad por la ciencia y todos los conocimientos entregados durante mi participación en el laboratorio LIMAB.

A mis amigos Fernanda, don Chris, Tamara, Anasol y Sebita gracias por todo su apoyo, risas y cariño. hacerme sentir cómoda en un lugar donde se puede reír, pensar y tirar veneno. Gracias por responder a todas las veces que necesite ayuda, por siempre tenerme presente a las horas de almuerzo, trabajos, traguitos por las tardes de invierno con nuestro uniforme de los bunkers y todos los momentos que atesoraré y recordaré por siempre

Además, se me hace importante agradecerle a la vida por hacerme chocar de frente e inesperadamente con esta área de la ciencia, mostrarme que la suerte me acompañará durante todos los desafíos que queden porque por aquí era el camino.

INDICE

Resumen.....	10
Abstract.....	12
1. Introducción.....	12
2 Marco teórico	15
2.1 Hongos promotores de crecimiento	16
2.2 Hongos endófitos	16
2.3 Hormonas vegetales tipo auxinas	18
2.4 Hormonas vegetales ácido giberélico	19
2.5 Co-cultivos fúngicos	20
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos Específicos.....	21
5. Materiales y metodo	21
5.1 Activación de cepas.	21
5.2. Crecimiento de las especies fúngicas en monocultivo y co-cultivo en medio sólido.....	22
5.3. Determinación del crecimiento micelial de las especies fúngicas en monocultivo y co-cultivo.....	23
5.4 Monocultivo y co-cultivo de especies fúngicas en medio liquido.....	23
5.5 Evaluación de ácido indol acético (AIA).	24
5.6 Evaluación del ácido giberelico GA ₃	24
5.7 Cromatografía de capa fina.....	24
5.8 Efecto del ácido giberélico (GA ₃) sobre el porcentaje de germinación <i>in vitro</i> :	25

5.9 Evaluación de los caldos de cultivo fúngicos en el crecimiento de <i>Solanum lycopersicum</i>	26
5.10 Análisis morfológicos.....	27
5.11 Parámetros fisiológicos	27
5.11.1 Pigmentos fotosintéticos.....	27
5.11.2 Máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (Fv/Fm)	28
5.12 Análisis estadísticos	28
6 Resultados	29
6.1 Evaluación de la interacción y crecimiento micelial de las especies fúngicas en monocultivo y cocultivo en medio sólido.	29
6.2 Producción de ácido indol acético por las cepas en monocultivo y co-cultivo	32
6.3 Cromatografía de capa fina (CCF) de los tres co-cultivos fúngicos en comparación a un control comercial.....	33
6.4 Producción de ácido giberélico por las diferentes cepas en monocultivo y co-cultivo.....	34
6.3 Cromatografía de capa fina (CCF) de los tres co-cultivos fúngicos en comparación a un control comercial de ácido giberélico (GA ₃)	36
6.5 Efecto del ácido giberélico (GA ₃) sobre el porcentaje de germinación <i>in vitro</i>	36
6.6 Evaluación de caldos de cultivo fúngicos en crecimiento y cambios morfológicos de <i>Solanum lycopersicum</i>	39
6.6 Evaluación de caldos de cultivo fúngicos en cambios fisiológicos de <i>Solanum lycopersicum</i>	42
6.7 Evaluación de pigmentos fotosintéticos en hojas de <i>Solanum lycopersicum</i>	43
7 Discusión.....	45
8 Conclusiones.....	51

Referencias.....	52
Anexos	60

índice de figuras

Figura 1: Patrón de crecimiento de *Umbelopsis* sp. (E-14), *M. importuna* (I2) y *M. tridentina* (T130) donde A) monocultivo y B) co-cultivo, se utilizaron placas con PDA y se evaluó a los 10 días de incubación a 24 °C. Las fotografías de cada hongo son en las placas Petri por el frente..... **31**

Figura 2: Concentración de AIA en µg/mL por las distintas cepas en monocultivo y co-cultivo. Los gráficos muestran la desviación estándar de un n = 3 y las letras representan las diferencias significativas entre tratamientos con un P<0.05 (Anova, Test Tukey)..... **33**

Figura 3: Cromatografía de capa fina (CCF) de ácido indol acético de los tres co-cultivos fúngicos y un control comercial donde de izquierda a derecha se encuentran los extractos de co-cultivos (E-14/130T); (E-14/I2); (130T/I2); (AIA comercial). A) sin solución reveladora. B) placa sumergida en solución reveladora..... **34**

Figura 4: Concentración de GA en µg/mL por las distintas cepas en monocultivo y co-cultivo. Los gráficos muestran la desviación estándar de un n = 3 y las letras representan las diferencias significativas entre tratamientos con un P<0.05 (Anova, Test Tukey).....**35**

Figura 5: Cromatografía de capa fina (CCF) de Ácido giberélico GA3 de los tres co-cultivos fúngicos y un control comercial donde de izquierda a derecha se encuentra la hormona comercial GA3 y los extractos de co-cultivos (130T/ I2); (130T/E-14); (E-14/I2);. (a) placa con solución reveladora. (b) placa con solución reveladora expuesta a luz UV.....**36**

Figura 6: Efecto del Ácido giberélico (GA) en la germinación *in- vitro* de *Solanum lycopersicum* en medio de cultivo MS luego de 30 días, donde control: medio MS sin GA; GA: Ácido giberélico comercial; T130/I2: Extracto de *M.tridentina*/*M. importuna*; T130/E-14: Extracto de *M. tridentina*/*Umbelospsis* sp.; I2/E-14: Extracto *M.importuna*/*Umbelospsis* sp. **A)** Porcentaje de germinación (%), **B)** vigor del alto de germinación, **C)** índice del vigor del peso de la plántula, **D)** plantas de *Solanum*

lycopersicum de los diferentes tratamientos. las letras representan las diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (Anova, Test Tukey).....**38**

Figura 7: Análisis morfológicos de plantas de *Solanum lycopersicum* luego de 45 días de cultivo en condiciones de invernadero, para los códigos de los tratamientos ver tabla 2. **A)** Biomasa radicular en (g); **B)** Biomasa aérea en (g). Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (Anova, Test Tukey).....**39**

Figura 8: Análisis morfológicos de plantas de *Solanum lycopersicum* luego de 45 días de cultivo en condiciones de invernadero, para los códigos de los tratamientos ver tabla 2.. **A)** Longitud del tallo (cm); **B)** Diámetro de altura de cuello (DAC) (mm); **C)** Número de hojas; **D)** Longitud radicular. Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (Anova, Test Tukey).....**40**

Figura 9: Plantas de *Solanum lycopersicum* seleccionadas de forma representativa por tratamiento luego de 45 días de cultivo en condiciones de invernadero para los códigos de los tratamientos ver tabla 2.....**41**

Figura 10: Cambios fisiológicos en plantas de *Solanum lycopersicum* luego de 45 días de cultivo en condiciones de invernadero donde **A)** Clorofila relativa [$\text{mg} \times \text{cm}^2$]. **B)** índice de performance **C)** Fv/Fm. para los códigos de los tratamientos ver tabla 2. Las letras representan las diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (Anova, Test Tukey).....**42**

Figura 11: Análisis de componentes principales (PCA) de los diferentes tratamientos (T0-T7) y las características morfofisiológicas de plantas de *Solanum lycopersicum*. BA: biomasa aérea; BR: Biomasa radical; LR: longitud radicular; Cl a y b: Clorofila a y b; DAC: diámetro a la altura del cuello; Fv/Fm: Fv/Fm = Relación entre la fluorescencia variable (Fv) y la fluorescencia máxima (Fm); pl: Eficiencia cuántica del fotosistema.....**44**

Indice de tablas

Tabla 1: Combinaciones de co-cultivos en medio de cultivo líquido PD utilizadas en el estudio.....	23
Tabla 2: Modelo de bioensayo en invernadero con diferentes tratamientos y código.....	27
Tabla 3: Pigmentos fotosintéticos de hojas de <i>S. lycopersicum</i> para los códigos de los tratamientos ver tabla 2.....	43

Lista abreviaturas

4-CI-IAA = Acido indol propiónico

ABA = Acido abscísico

Abs: Absorbancia

AIA = Acido indol acético

AIB = acido indol butírico

CCF = Cromatografía de capa fina

cm: Centímetro

CMS = Consorcios microbianos sintéticos

Fv/Fm = Relación entre la fluorescencia variable (Fv) y la fluorescencia máxima (Fm)

GA = Acido giberélico

GGPP = Geranilgeranilo

HE = Hongos endófitos

IVLS = Índice del vigor del largo de la planta

IVPS = Índice del vigor del peso de la planta

mg: Miligramos

mL: Mililitros

MS = Metabolitos secundarios

PD= Papa dextrosa

Pi = Eficiencia cuántica del fotosistema

PSI = Fotosistema I

PSII = Fotosistema II

RF = Factor de retención

UV: Ultravioleta

µg: Microgramo

µL: Microlitro

Resumen

Los hongos promotores de crecimiento vegetal son microorganismos que habitan en la rizosfera y son reconocidos por su capacidad para mejorar tanto los mecanismos de defensa de las plantas como su crecimiento general. Entre estos

hongos, se encuentra el género *Umbelopsis*, que se destaca por su habilidad para promover la salud vegetal a través de la producción de metabolitos secundarios los cuales no solo favorecen el crecimiento de las plantas, sino que también aumentan su resistencia frente a estrés bióticos y abióticos. Otro género relevante es *Morchella*, conocido por su valor nutricional y medicinal. Además de sus propiedades alimenticias, los hongos del género *Morchella* también han demostrado un notable potencial en la promoción del crecimiento vegetal. Este efecto positivo se lleva a cabo mediante la secreción de fitohormonas, como auxinas y giberelinas, que son esenciales en procesos fisiológicos clave como la germinación, elongación y maduración de las plantas. En este estudio se evaluó la interacción entre dos especies de hongos utilizando la técnica de co-cultivo fúngico. El objetivo fue potenciar la producción fitohormonas y fomentar la interacción entre los hongos para incrementar la producción de fitohormonas en comparación con un monocultivo tradicional. Posteriormente, estas fitohormonas se aplicaron a plantas de *Solanum lycopersicum* en diferentes etapas y condiciones de crecimiento, y se compararon a uso de hormonas comerciales. Los resultados obtenidos fueron variados. No todos los co-cultivos fúngicos mostraron un aumento significativo en la producción de auxinas en comparación con el monocultivo; sin embargo, se observó un incremento notable en la producción de giberelinas mediante esta técnica, alcanzando hasta (70 µg/mL) en el co-cultivo de *Morchella importuna* y *Morchella tridentina*. Los bioensayos realizados revelaron que, durante la etapa de germinación, el uso de extractos provenientes de co-cultivos fúngicos puede acelerar el crecimiento de los cotiledones en condiciones in vitro. Asimismo, las pruebas en plantas cultivadas en invernadero demostraron que el desarrollo morfológico alcanzado era comparable al de aquellas tratadas con hormonas comerciales, tanto en el crecimiento aéreo como radicular, destacándose especialmente los resultados obtenidos con el co-cultivo de *Morchella*. Estos hallazgos respaldan el potencial de los hongos con capacidad promotora del crecimiento vegetal como una alternativa innovadora y sostenible para la agricultura moderna.

Abstract

Plant growth promoting fungi are microorganisms that inhabit the rhizosphere and are recognized for their ability to enhance both plant defense mechanisms and overall plant growth. Among these fungi is the genus *Umbelopsis*, which stands out for its ability to promote plant health through the production of secondary metabolites that not only favor plant growth, but also increase plant resistance to biotic and abiotic stresses. Another relevant genus is *Morchella*, known for its nutritional and medicinal value. In addition to their nutritional properties, fungi of the genus *Morchella* have also demonstrated a remarkable potential in promoting plant growth. This positive effect is carried out through the secretion of phytohormones, such as auxins and gibberellins, which are essential in key physiological processes such as plant germination, elongation and maturation. In this study, the interaction between two fungal species was evaluated using the fungal co-culture technique. The objective was to enhance phytohormone production and promote interaction between fungi to increase phytohormone production compared to a traditional monoculture. Subsequently, these phytohormones were applied to *Solanum lycopersicum* plants at different growth stages and conditions, and compared to the use of commercial hormones. The results obtained were varied. Not all fungal co-cultures showed a significant increase in auxin production compared to monoculture; however, a remarkable increase in gibberellin production was observed using this technique, reaching up to (70 µg/mL) in the co-culture of *Morchella importuna* and *Morchella tridentina*. The bioassays performed revealed that, during the germination stage, the use of extracts from fungal co-cultures can accelerate the growth of cotyledons under in vitro conditions and in greenhouse plants showed that the morphological development achieved was comparable to that of plants treated with commercial hormones in relation to their aerial and root development, especially highlighting the results obtained with the co-culture of *Morchella*. These results affirm the promising potential of plant growth promoting fungi as an innovative and sustainable alternative to improve modern agriculture.

1. INTRODUCCIÓN.

Las hormonas vegetales promotoras del crecimiento vegetal son una herramienta útil para la agricultura, son cruciales para el desarrollo de las plantas, impulsan el crecimiento y maduración, también regulan los movimientos de crecimiento de las plantas y la retención de sus órganos (Ramos-Lopez, 2024). La obtención de este tipo de hormonas se da a partir de microorganismos presentes en la rizósfera que mediante un intercambio de nutrientes a través de las raíces de las plantas desempeñan un papel vital en el desarrollo y crecimiento de las plantas al influir en diversos procesos fisiológicos (Rodríguez-Sahagún et al., 2020). Se clasifican en diferentes grupos según su función y estructura química. Entre ellos se encuentran: auxinas, giberelinas y citoquininas, entre los principales (González et al., 2024). Cada uno de estos reguladores cumple funciones específicas en el ciclo de vida de las plantas, iniciando desde la germinación de semillas hasta la maduración de los frutos (Jordan & Ruthmil, 2024). Mantener un equilibrio adecuado de estos reguladores es crucial para asegurar un crecimiento óptimo y una respuesta apropiada a las condiciones ambientales (Ramírez, 2019).

Dos ejemplos de reguladores de crecimiento, más utilizados y solicitados en cultivos vegetales, son auxinas y giberelinas. El ácido indol acético (AIA), un tipo de auxina que participa en los procesos de desarrollos de las plantas, interviniendo en los procesos de la división, elongación, siendo una de las características más importantes de estas fitohormonas (Cango, 2024). Las giberelinas (GA) tienen una amplia gama de funciones en las plantas, incluida la regulación del crecimiento, floración, germinación de las semillas y formación de fruto (Silva., 2024). Además, actúan en conjunto con otras hormonas vegetales, que sirven para coordinar el crecimiento y el desarrollo de la planta en respuesta a señales ambientales y endógenas (Barcia, 2020).

Los hongos endófitos son componentes natural es del microecosistema de las plantas, afectan positivamente las actividades fisiológicas del huésped, incluida la producción de hormonas, la biosíntesis y adquisición de nutrientes para el desarrollo de la planta, la secreción de metabolitos adaptadores de estrés para proteger a la planta huésped de la invasión de herbívoros y patógenos, y la mejora de la

adaptabilidad del huésped a los factores de estrés abióticos (Banda Gutiérrez, 2024). A cambio, las plantas proporcionan hábitats y nutrientes para los hongos endófitos (Wen et al. 2022; Gutiérrez, 2024). Los hongos del género *Umbelopsis* pueden producir ácidos grasos poliinsaturados, que se utilizan en medicina, farmacología, cosméticos, industria alimentaria y agricultura (Grantina-levina et al., 2014). *Umbelopsis* spp. se observó como uno de los endófitos fúngicos con la mayor frecuencia de aislamiento, dominando los tejidos de la raíz y el tallo de las especies de *Pinus* (Rim et al., 2021), además de estar presentes en raíces de *Araucaria araucana* y se caracterizó como una especie que estimula el crecimiento de plantas (Chávez et al., 2023; Diaz Valenzuela et al. 2024)

Otro tipo de hongo es de la especie *Morchella* perteneciente a la división Ascomycota, familia Morchellaceae, con varias especies comestibles de gran importancia alimenticia y biotecnológica. Las especies de *Morchella* han sido encontradas en diferentes ambientes (Machuca et al. 2021; Ortega-Vargas et al., 2023), por lo que su estado trófico sigue siendo incierto, algunos la han clasificado como micorrízico (Patricio, 2010), otros como saprófito (Morcillo y Sanchez, 2004). Si bien este es un género que presenta varias especies cosmopolita con una amplia distribución e interés gastronómico. Existe investigación sobre su potencial biotecnológico enfocado en la promoción del crecimiento vegetal y protección contra patógenos en especies como *Zea mays* var *saccharata* o maíz dulce, mejorando la altura de la planta, biomasa y desarrollo de raíces (Phanpadith et al., 2019).

Estas dos especies de hongos pueden producir fitohormonas vegetales en monocultivos en fermentación líquida. Existen técnicas que pueden optimizar la producción de metabolitos y compuestos de interés agrícola, como por ejemplo un co-cultivo el cual hace referencia al conjunto de microorganismos simbiotes que mejoran el crecimiento y aptitud de la planta como los hongos y rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas que se encuentran de manera frecuente en la rizosfera de diferentes cultivos (Bhattacharyya & Jha, 2012; Postma & Schilder, 2015). El uso de estos consorcios probióticos ha demostrado tener la capacidad de modelar y reformar el microbioma de rizosfera para promover el crecimiento,

supresión de enfermedades de la planta y nivelación en el desequilibrio microecológico, aumentando la salud relativa de la misma (Hu et al., 2016).

El co-cultivo fúngico de múltiples especies de hongos en interacción, ofrece una alternativa prometedora al monocultivo fúngico para estimular el crecimiento vegetal. A diferencia del monocultivo, el co-cultivo permite aprovechar la sinergia entre diferentes cepas fúngicas, potenciando la solubilización de nutrientes, la producción de fitohormonas y la supresión de patógenos de manera más eficiente. Para así aprovechar la complejidad de las interacciones entre hongos y plantas como también entre las propias cepas fúngicas. Esto ofrece un desafío en comprender y manipular las interacciones fúngicas para diseñar co-cultivos a que maximicen los beneficios para el crecimiento vegetal (Flores-Córdova et al., 2023).

En este estudio, se plantean dos hipótesis. La primera sugiere que el co-cultivo fúngico de especies de *Morchella* y *Umbelopsis* sp. generará una mayor producción de fitohormonas del tipo auxinas y giberelinas en comparación con el monocultivo de estas especies. La segunda hipótesis postula que las fitohormonas producidas en el contexto del co-cultivo estimularán el crecimiento de la planta *Solanum lycopersicum* en condiciones controladas e invernadero. Con base en estas hipótesis, el objetivo general de la investigación es evaluar el efecto del co-cultivo fúngico de *Morchella* y *Umbelopsis* sp. sobre la producción de fitohormonas y su impacto en la estimulación del crecimiento de *Solanum lycopersicum*. Este enfoque permitirá comprender mejor las interacciones entre los hongos y las plantas, como su potencial de aplicación en la agricultura.

2 MARCO TEORICO

2.1 Hongos promotores de crecimiento

Los hongos promotores del crecimiento vegetal (HPCV) son microorganismos residentes en el suelo de la rizosfera de varios cultivos y pueden formar asociaciones endofíticas e interactuar con otros microorganismos que solubilizan y fijan nutrientes, produciendo sustancias promotoras del crecimiento vegetal, e induciendo la resistencia de las plantas a enfermedades (Hermosa et al., 2011; Barquero, 2024). Los HPCV se les conoce por mejorar los mecanismos de defensa y el crecimiento en las plantas (Cano, 2011). Desempeñan diversas funciones en las plantas, entre ellas destacan: potencial biocontrolador de microorganismos al competir por espacio y nutrientes: son productores de hormonas de crecimiento, solubilización de minerales, resistencia micoparasítica y saprofitica, colonización de raíces y resistencia sistémica inducida (RSI) en las plantas (Adedayo y Babalola, 2023).

Los microorganismos promotores de crecimiento tienen la capacidad de sintetizar hormonas vegetales que son moléculas que controlan la gran mayoría de los procesos fisiológicos y bioquímicos como la división celular, el crecimiento, la diferenciación de los órganos aéreos y de las raíces de las plantas (Tanya et al. 2019). Entre estas especies promotoras del crecimiento vegetal, se encuentran también los hongos endófitos (HE).

2.2 Hongos endófitos

Los HE se definen como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar un daño evidente, incluso en algunos casos es necesaria para la sobrevivencia de la especie vegetal (Ortega et al. 2020). Esta asociación mutualista es beneficiosa para ambos, otorgando hospedaje y protección a los HE y a su vez estos hongos otorgan nutrientes, protección, impulsan el crecimiento radicular y aéreo, aumentando su tolerancia al estrés (biótico y abiótico) al producir metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural que le brindan protección y resistencia contra herbívoros, microorganismos patógenos y distintos estreses ambientales (Sánchez et al. 2013). Estos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar hormonas

vegetales como ácido indolacético, ácido giberélico, ácido abscísico, ácido indolbutírico, que son moléculas que controlan la mayoría de los procesos fisiológicos y bioquímicos como la división celular, el crecimiento, la diferenciación de los órganos aéreos y de las raíces de las plantas (Caballero, 2023).

El género *Umbelopsis*, es clasificado en la familia Umbelopsidaceae y el orden Mucorales. Los miembros de este género se caracterizan por su crecimiento lento y la formación de una capa aterciopelada. Son saprófitos que pueden dominar el suelo forestal tras una perturbación (Sukdeo et al., 2019). Las especies dentro de este género desempeñan diversas funciones; por ejemplo, *U. amos* y *U. Mucoromycota* están bien documentadas como productoras de lipasas y lípidos, mientras que *U. isabellina* y *U. vinacea* se utilizan en la industria, especialmente en la producción de detergentes. Además, las especies de *Umbelopsis* podrían actuar como endófitas en varias plantas, promoviendo su crecimiento (Aquino et al., 2023). Se ha observado que la cepa *U. dimorpha* JSNL001-1 tiene un impacto significativo en la mejora de la tasa de crecimiento y resistencia a la sequía en *Dendrobium officinale* (Xu, 2014). Investigaciones previas han demostrado su capacidad para producir la fitohormona ácido indolacético (AIA) en cantidades notables, alcanzando 52,29 mg L⁻¹ (Díaz-Valenzuela et al., 2024). Además de generar AIA, las especies del género también secretan diversos compuestos fenólicos y ácidos orgánicos que favorecen el crecimiento vegetal. Esto fue evidenciado en el estudio de Qin et al. (2018), donde se analizó la producción de distintos metabolitos por *U. dimorpha* en interacción con la planta *Kadsura angustifolia*, lo que resultó en cambios en algunos metabolitos específicos del huésped.

Otras especies de hongo realizan un intercambio, liberación de nutrientes o características beneficiosas que se les puede dar un uso beneficioso para las plantas. Las *Morchella* tienen un alto valor nutricional y medicinal, con una larga cultura de consumo en todo el mundo, La mayoría de ellas se consideran saprobias (Alvarado-Castillo et al. 2015).

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). Son consideradas una rica fuente de compuestos bioactivos que mejoran la salud y el bienestar humanos (Liu et al. 2023). Hasta el momento existen estudios sobre si esta especie además de sus características beneficiosas para la salud humana tenga algún efecto promotor de crecimiento vegetal, se han informado que varias especies de *morchella* interactúan con las raíces de muchas de plantas formando diferentes tipos de asociaciones (Snabl et al., 2019) entre ellas se han descrito especies de *morchella* ectomicorrícicas (Dahlstrom et al., 2000) y endófitas (Harman and Uphoff, 2019) A través de estas asociaciones, se facilita el intercambio de sustancias bioactivas, como las fitohormonas, que podrían influir en el desarrollo vegetal. En particular, en especies como *M. importuna* y *M. tridentina* se ha reportado la producción de hormonas del tipo auxinas, específicamente ácido indolacético, con una concentración de 50 y 80 mg/L respectivamente (Arroyo, 2023).

2.3 Hormonas vegetales tipo auxinas

Gran parte de los mecanismos y regulaciones de las plantas se producen gracias a las fitohormonas, siendo las principales auxinas, citoquininas, giberelina, ácido abscísico, etileno y ácido salicílico (Alcántara-Cortes et al. 2019). Las auxinas incluyen un grupo de moléculas importantes que se encuentran en plantas, hongos y bacterias. El tipo de auxina más abundante en la naturaleza es el ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol propiónico (4-Cl-IAA), ácido indol-3-butírico (AIB) que se encuentran en menores cantidades en las plantas (Báez-Pérez et al., 2015).

Una de las fitohormonas secretada por algunos HE es el ácido indol acético (AIA), hormona importante en los procesos relacionados con el crecimiento de las plantas, como la elongación celular, el desarrollo del tejido vascular y la dominancia apical (Andrade Ayala et al. 2020). El ácido indol acético (AIA) auxina predominante y más

importante en plantas, es conocido por estimular la elongación celular (Añez-Lara y Gutiérrez-Ramírez, 2020). La síntesis de esta hormona se lleva a cabo por una vía independiente del triptófano y por otra dependiente de este, siendo esta última la más importante (Borjas-Ventura et al., 2020). El triptófano es un aminoácido precursor de la producción de ácido indol acético, y es ampliamente utilizado para la producción de fitohormonas de microorganismos que tengan vía dependiente de este aminoácido el cual es exsudado a través de las raíces de las plantas (Granados, 2023). Se han realizado estudios en hongos productores de AIA, como es el caso de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus*, debido al potencial de estos hongos para sintetizar Metabolitos Secundarios (MS), como el ácido-3-indolacético (AIA) (Ortuño, 2013). Para el caso particular de *Aspergillus awamori* se ha reportado una producción de 24,2 ug/mL de AIA (Mehmood et al., 2019).

2.4 Hormonas vegetales ácido giberélico

El ácido giberélico es un regulador de crecimiento que tiene un efecto importante en el desarrollo y la productividad de las plantas, promueve el crecimiento de raíces, brotes y hojas modificando los procesos de división y elongación celular (El-Nwehy y Afify, 2023; Sevgi et al., 2021). Un tipo de hormona dentro de las giberelinas identificada como GA₃ es especialmente importante y ampliamente utilizado como regulador del crecimiento de las plantas en diversas aplicaciones, como agricultura, viveros, cultivo de tejidos y jardines (Ghimire et al., 2021). GA₃ es producido naturalmente por plantas y microorganismos, más específicamente por hongos y bacterias, la obtención y producción masiva de esta hormona vegetal natural se realiza mediante la tecnología de fermentación , el primer microorganismo de obtención fue *Fusarium moniliforme* hongo que se conocía anteriormente como *Gibberella fujikuroi* (Pandya et al., 2023).

El GA₃ se forma como un diterpeno a través de la vía biosintética de los isoprenoides. Se inicia con el ácido mevalónico que se convierte en pirofosfato de geranylgeranilo (GGPP) en el citosol. El GGPP se convierte luego en *entkaureno*, que es el primer intermediario en la biosíntesis de GA₃, puede tener distintos tipos de alteraciones que interfieren para beneficiar o perjudicar la

producción de la fitohormona estas variables pueden ser: pH, nitrógeno del medio de cultivo, glutamina y sus represores como L-metionina (Pandya et al., 2023 y Muñoz & Agosin, 1993)

2.5 Co-cultivos fúngicos

Las comunidades microbianas sintéticas (CMS) son co-cultivos de una variedad de microbios compatibles que promueven efectos sinérgicos entre grupos de microorganismos, como la inducción de la expresión genética y la expansión de la producción de metabolitos, las CMS han mostrado una mejor actividad de biocontrol y estabilidad que las cepas individuales (Zhu et al., 2024).

El co-cultivo de microorganismos considera la presencia de dos microorganismos diferentes en el mismo sistema de cultivo *in vitro*, simulando artificialmente el complejo del entorno microbiano en el medio ambiente (Arias 2024). Al tener este cultivo de dos especies en un mismo ambiente existe la competencia por nutrientes y espacio entre las dos cepas diferentes, esto provoca un aumento en la producción de metabolitos secundarios, enzimas y componentes con un potencial uso (Kim, 2023).

Debido a esto es de interés crear un co-cultivo de dos especies con capacidad de producción de componentes que tengan actividad promotora del crecimiento vegetal, como lo son la especie de hongo endófito principalmente del género *Umbelopsis* que en estudios previos ha demostrado actividad promotora de crecimiento. En conjunto con especies poco estudiadas en el área biotecnológica, pero de gran interés comercial, como lo son las especies de *Morchella tridentina* y *Morchella importuna*, estas con antecedentes previos de producción de AIA (Arroyo 2023), y así potenciar los rendimientos de producción en comparación con las cepas individuales.

3. Hipótesis

1. El co-cultivo fúngico de especies de *Morchella* y *Umbelopsis* sp. tendrá mayor producción de fitohormonas en comparación al monocultivo.

2. Las fitohormonas producidas en el co-cultivo estimularán el crecimiento de plantas de *Solanum lycopersicum* en condiciones controladas e invernadero

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del co-cultivo fúngico de especies de *Morchella* y *Umbelopsis* sp. sobre la producción de fitohormonas (AIA y GA3) y su efecto en la estimulación del crecimiento de *Solanum lycopersicum*.

4.2 Objetivos Específicos

- 1) Comparar los niveles de auxinas y giberelinas producidos en monocultivo y co-cultivo fúngico de *Morchella* y *Umbelopsis* sp.
- 2) Caracterizar cualitativamente la producción de AIA y GA por cromatografía de capa fina.
- 3) Evaluar el efecto de los extractos fúngicos de AIA y GA en los cambios morfológicos y fisiológicos en plantas de *Solanum lycopersicum* bajo condiciones controladas de laboratorio e invernadero.

5. MATERIALES Y METODO

5.1 Activación de cepas.

Las cepas previamente identificadas como, *Umbelopsis* sp. (E-14), *Morchella importuna* (I2) y *Morchella tridentina* (130T), se activaron desde la colección de hongos del Laboratorio de Investigación de Micorrizas y Aplicaciones Biotecnológicas de Hongos (LIMAB) y Laboratorio de Biotecnología de Hongos (LBH), en medio de cultivo papa dextrosa agar PDA pH 5,8, colocando un disco

agar/micelio de 0,5 cm en el centro de la placa. Las distintas cepas se incubaron a $24 \pm 1^\circ \text{C}$ en oscuridad completa durante un periodo de 10 días.

5.2. Crecimiento de las especies fúngicas en monocultivo y co-cultivo en medio sólido.

La compatibilidad de *M. tridentida*, *M. importuna* y *Umbelopsis sp.* fue evaluada a través de las interacciones (positivas, negativas o neutras) entre ambas cepas en medio de cultivo sólido, en placas de Petri (9 cm) conteniendo medio PDA. Las placas se inocularon utilizando un disco de agar/micelio (5 mm) dispuestos uno frente al otro, y aprox. 2 cm del borde de la placa, separados por una distancia de 5 cm entre sí (Fig. 1). Los cultivos control correspondieron a los monocultivos de cada especie fúngicas, se inocularon a 2 cm del borde de la placa, utilizando un disco de agar/micelio (5 mm). Todos los ensayos se realizaron en triplicado y las placas se incubaron en estufa (Binder BD 240) a $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, en oscuridad.

Se realizaron registros fotográficos a los 10 días, evaluando los tipos de interacción entre las colonias fúngicas, utilizando una clave basada en las observaciones de Molla et al. (2001), donde se reconocieron 3 modos distintos de interacción: I. Crecimiento micelial mutuamente entremezclado de las colonias de ambos hongos, sin signos macroscópicos de interacción.

II. Crecimiento micelial parcialmente entrelazado de las colonias, un hongo se comporta como dominante respecto al otro.

III. (i) Crecimiento entremezclado, donde el micelio del hongo de interés crece por encima o por debajo del micelio del hongo opuesto. (ii) Crecimiento entremezclado, donde el hongo de interés cesa su crecimiento y es sobrecrecido por el micelio del hongo opuesto.

IV. Inhibición leve del crecimiento micelial cuando los hongos se acercan hasta casi entrar en contacto, formando una línea claramente visible de demarcación, de 1-2 mm, entre las dos colonias fúngicas.

V. Inhibición micelial mutua a una distancia > 2 mm.

5.3. Determinación del crecimiento micelial de las especies fúngicas en monocultivo y co-cultivo.

Las mediciones en medio sólido en monocultivo y co-cultivo se realizaron a los 10 días. El parámetro registrado fue el diámetro máximo de las colonias (cm) (monocultivo y co-cultivo). Todas las mediciones fueron realizadas según Molla et al. (2001).

5.4 Monocultivo y co-cultivo de especies fúngicas en medio líquido

Se prepararon dos medios de cultivo utilizando como base el medio líquido papa dextrosa (PD), el primero se utilizó para la producción de hormonas tipo auxinas y fue suplementado con 0.5 mg/mL del precursor triptófano. El segundo medio de cultivo utilizado para la producción de giberelinas se suplemento con 3 mM de metionina. En matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 120 ml de caldo de cultivo se inoculó con tres discos de agar micelio de 5 mm cada uno, luego se mantuvieron en agitación de 120 rpm a 24°C por 10 días.

Para el co-cultivo se utilizaron los mismos medios de cultivo y condiciones de crecimiento, cada matraz fue inoculado con 3 disco de agar micelio de 5 mm de cada especie fúngica con las siguientes combinaciones.

Tabla 1: Combinaciones de co-cultivos en medio de cultivo líquido PD utilizadas en el estudio.

N°	Interacción
1	<i>Umbelopsis</i> sp. / <i>Morchella tridentina</i> (E14/T130)
2	<i>Umbelopsis</i> sp. / <i>Morchella importuna</i> (E14/I2)
3	<i>Morchella tridentina</i> / <i>Morchella importuna</i> (T130/I2)

Los resultados obtenidos del monocultivo de especies se utilizaron como control para evaluar la producción de fitohormonas del co-cultivo. Los matraces se inocularon en triplicado por cada combinación y monocultivo de cepa fúngica, y se prepararon controles conteniendo el medio de cultivo suplementados sin inocular. Pasados los 10 días de incubación mediante filtración al vacío se recuperó el caldo para determinar la concentración de fitohormonas.

5.5 Evaluación de ácido indol acético (AIA).

La concentración de auxinas del tipo AIA se realizó siguiendo la metodología descrita por Sadaf et al., (2009). Para ello, se preparó el reactivo de Salkowski, mediante una solución de 15 mL de $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M) a la que se añadió 300 mL de H_2SO_4 (98% v/v) y 500 mL de agua destilada (Acuña et al., 2011). Luego, 1 mL de sobrenadante se mezcló con el 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 a partir de concentraciones conocidas de AIA (10-50 mg/L).

5.6 Evaluación del ácido giberelico GA_3 .

La metodología empleada en este estudio se basa en el enfoque descrito por Hasan (2002). El caldo filtrado se centrifugo durante 5 min a 4400 rpm y el sobrenadante se ajustó a un pH de 2,8 utilizando 1 M HCl, luego se extrajo tres veces con acetato de etilo utilizando un volumen igual al del sobrenadante (proporción 1:1). Los extractos de acetato de etilo se juntaron y se evaporaron al vacío en un evaporador rotatorio modelo IKA RB8 a 50 °C.

Luego de 24 horas con los precipitados ya secos, se disolvieron en 10 ml de una mezcla de etanol: H_2SO_4 (90:10). La absorbancia se midió a $\lambda = 254$ nm en cubetas de cuarzo utilizando el espectrofotómetro UV-visible. La concentración de GA_3 en los cultivos se determinó utilizando una curva de calibración de GA_3 puro como estándar.

5.7 Cromatografía de capa fina.

Para este ensayo se ocupó la metodología de Castillo et al. (2007), donde se preparó una solución estándar de AIA en una concentración de 1 mg/mL disuelto en metanol, para poder comparar con los extractos obtenidos previamente (ítem 5.5 y 5.6). En las placas de Sílice 60 F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt), se depositó 10 μL , de la solución estándar y de los extractos fúngicos. Como fase móvil se utilizó benceno/

acetato de etilo/ ácido acético (70:25:5) y como resolución reveladora (H₂SO₄ 60%, FeCl₃ 28 Mm). Para la visualización de las bandas, se ocupó luz natural y luz ultravioleta. Para el Ácido giberélico (GA₃) se siguió la metodología descrita por Tripathy y Rath (2020). La placa se activó en un horno a 80° C durante 1 h, se utilizó como fase móvil disolvente isopropanol: amoníaco: agua en la proporción 10:1:1. Se depositaron 30µl del extracto orgánico en la placa de TLC y el estándar GA₃ disuelto en metanol se usó como referencia, se corrió durante dos horas. Se retiraron las placas y bajo campana de extracción se rociaron con ácido sulfúrico al 3% que contenía 50 mg de FeCl₃ y se calentaron en un horno a 80 °C durante diez minutos. Las placas se observaron bajo luz ultravioleta para detectar la presencia de manchas de fluorescencia verdosa. Luego se calculó el factor de retención (Rf) para cada fitohormona, utilizando la siguiente formula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia de desplazamiento del soluto}}{\text{Distancia de desplazamiento del disolvente}}$$

La constante Rf es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente (Mendez et al., 2023).

5.8 Efecto del ácido giberélico (GA₃) sobre el porcentaje de germinación *in vitro*:

Se evaluó el efecto del ácido giberélico (GA) en la germinación de *Solanum lycopersicum*. Este ensayo se realizó en condiciones *in-vitro* utilizando placas Petri de plástico con medio de cultivo MS sólido, los cuales fueron suplementados con GA₃ comercial a una concentración de 0,025 mg L⁻¹ (Zambrano-Arteaga et al., 2022) como control positivo, extracto fúngico que fue esterilizado mediante filtro de jeringa (22 µM), a igual concentración del control positivo y como control negativo medio sin suplementación. En cada placa se sembraron 20 semillas de *Solanum lycopersicum* y los ocho tipos de tratamiento (Tabla 2) se realizaron en quintuplicado. El porcentaje de germinación se evaluó una vez las semillas presentaron clara evidencia de germinación como es la emergencia de los

cotiledones, una vez pasado este tiempo, se contabilizó el número de semillas germinadas, sobre el número total de semillas sembradas para cada placa, calculando así el % de germinación (%), índice de vigor de la longitud de la plántula (IVLS) e índice de vigor del peso de la plántula (IVPS) (Ghodrat et al., 2013; Aloui et al., 2014; Anupama et al., 2014; Heydariyan et al., 2014)

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{\text{número total de semillas germinadas}}{\text{total de semillas sembradas}} \times 100$$

$$(IVLS) = \text{Longitud de la plantula (cm)} \times \% \text{ de germinación}$$

$$(IVPS) = \text{Peso seco de la plantula (mg)} \times \% \text{ de germinación}$$

5.9 Evaluación de los caldos de cultivo fúngicos en el crecimiento de *Solanum lycopersicum*

Para la germinación de las semillas, se utilizó un sustrato compuesto por perlita, vermiculita y turba en una proporción de 2:2:1, el cual fue previamente esterilizado tres veces durante una hora en autoclave a una presión de 1 atm y 121 °C (Huxley, 340). Se emplearon bandejas de germinación de 50 cc, depositando una semilla de la planta seleccionada en cada cubeta. Una vez que las plantas desarrollaron cuatro hojas verdaderas, se trasplantaron individualmente a macetas de 1 L y se inició la evaluación de los extractos. El ensayo constó de ocho tratamientos: extractos de los tres co-cultivos fúngicos (Tabla 1), inóculo fúngico de los tres co-cultivos, un control con hormona comercial y un control negativo. Para los tratamientos con extractos fúngicos y hormona comercial, se ajustó a la concentración más baja obtenida en la producción de ácido indolacético (Figura 2), administrando 4 mL de cada extracto y hormona comercial en tres dosis cada diez días. En el tratamiento con inóculos, se trituraron 1 g de biomasa fresca, que se disolvió en 100 mL de agua

estéril; este procedimiento se repitió dos veces cada diez días. Las plantas fueron ordenadas de manera aleatoria y mantenidas bajo condiciones de invernadero, cubiertas con malla Rachel que proporcionaba un 80 % de cobertura, en la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. Al finalizar los 40 días del ensayo, se evaluaron los parámetros morfológicos y fisiológicos de las plantas

Tabla 2: Modelo de bioensayo en invernadero con diferentes tratamientos y código

Tratamiento	Forma de aplicación	Código
Control	Solo agua	T0
Hormona comercial (Merck)	Hormona comercial de AIA	T1
Caldo de cultivo T130/I2	Extracto de <i>M. tridentina</i> / <i>M. importuna</i>	T2
Caldo de cultivo E-14/I2	Extracto de <i>Umbelopsis sp./M. importuna</i>	T3
Caldo de cultivo E-14/T130	Extracto de <i>Umbelopsis sp./ M.tridentina</i>	T4
Inoculo T130/I2	Micelio de <i>M. tridentina</i> / <i>M. importuna</i>	T5
Inoculo E-14/I2	Micelio de <i>Umbelopsis sp./M. importuna</i>	T6
Inoculo E-14/T130	Micelio de <i>Umbelopsis sp/M. tridentina</i>	T7

5.10 Análisis morfológicos

Terminado el periodo de los ensayos se comenzó con la evaluación de las variables respuestas. Las variables morfológicas que se midieron fue longitud del tallo (cm), el cual se consideró desde la primera proyección del tallo (cuello) hasta el meristema apical, el largo de la raíz se consideró desde la primera proyección de la raíz hasta la punta del ápice de la raíz más larga (cm) y número de hojas. La biomasa se midió pesando la parte aérea y radical por separado las cuales fueron cortadas con bisturí, se calculó el peso fresco y posteriormente el peso seco, el cual se realizó luego de secar en estufa ambas partes a 72° por 48 horas.

5.11 Parámetros fisiológicos

5.11.1 Pigmentos fotosintéticos

La obtención de los pigmentos fotosintéticos se realizó extrayendo discos foliares de 5 mm de hojas desde la sección media de la planta, los cuales se

sumergieron en acetona al 80% v/v. Luego fueron calentadas en baño de agua a 80°C durante 10 minutos logrando extraer los pigmentos. Luego se midió la absorbancia de los pigmentos fotosintéticos a 470, 646,8 y 663,2 nm en espectrofotómetro (Aroca, 2001). Los coeficientes de extinción y las ecuaciones utilizadas fueron reportados por Lichtenthaler (1977).

$$C_a = 12.25A_{663.2} - 2.79A_{646.8}$$

$$C_b = 21.50A_{646.8} - 5.10A_{663.2}$$

$$C_{a+b} = 7.15A_{663.2} + 18.71A_{646.8}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b) / 198$$

5.11.2 Máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (Fv/Fm)

Se midió la fluorescencia de la clorofila II utilizando un fluorímetro Hansatech modelo pocket PEA Chlorophyll fluorimeter. Las mediciones se realizaron adaptando las hojas a la oscuridad con clips de hojas durante 20 min. El cálculo se realizó por el instrumento a partir de la relación de fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) que refleja la eficiencia cuántica máxima del PSII (Aghai et al. 2019).

5.12 Análisis estadísticos

La normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza se evaluaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La significación estadística se determinó usando test de tukey ($p < 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software STATISTICA ver. 10 (Statsoft). Además se realizó un análisis factorial utilizando la extracción de componentes principales (CP) y un análisis de conglomerados utilizando el método del vecino más lejano para clasificar a los individuos experimentales en grupos homogéneos (Chávez et al., 2020).

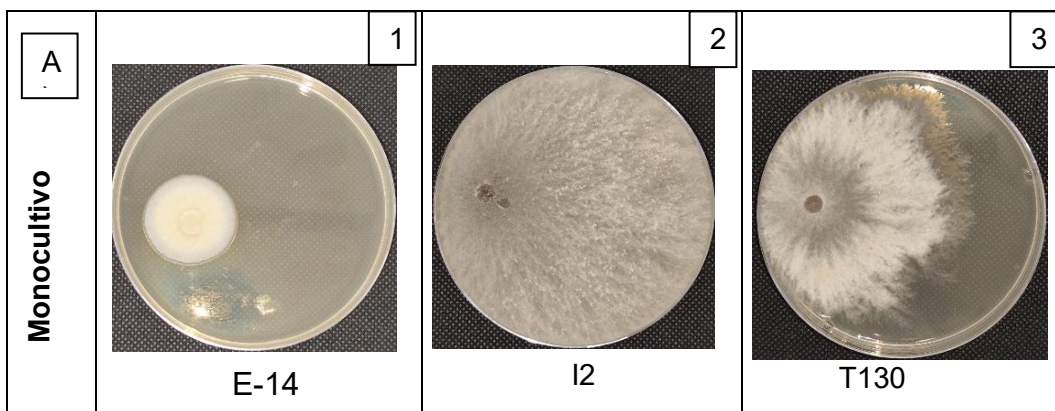
6 Resultados

6.1 Evaluación de la interacción y crecimiento micelar de las especies fúngicas en monocultivo y cocultivo en medio sólido.

La morfología de los micelios y crecimiento (cm) de las especies de *Umbelopsis* sp. (E-14), *M tridentina* (T130) y *M importuna* (I2) fueron evaluadas a los 10 días en medio de cultivo PDA. Los patrones de crecimiento se evaluaron en mono y cocultivo. El crecimiento individual de *M. importuna* se caracterizó por la formación de micelio blanco y abundante, que colonizó la totalidad de la placa Petri a los 10 días

(Fig1. A). En cambio, la especie de *M. tridentina* y *Umbelopsis* sp. presentan un crecimiento menos agresivo en comparación con *M. importuna*, obteniendo el menor desarrollo micelial en E-14.

Al comparar el desarrollo de las diferentes especies en co-cultivo se observó que T130 y I2 tuvieron un crecimiento menos abundante que los monocultivos cuando están en interacción con el hongo endófito E-14. Este último creció de la misma forma que, en monocultivo, aun así no se observó inhibición o bloqueo de los micelios (Fig1.B), además no se observó pigmentación en el interfaz de los micelios en co-cultivo. El patrón de crecimiento en todos co-cultivos es del tipo entremezclado, en el caso del co-cultivo sugiriendo que las cepas son compatibles entre sí.



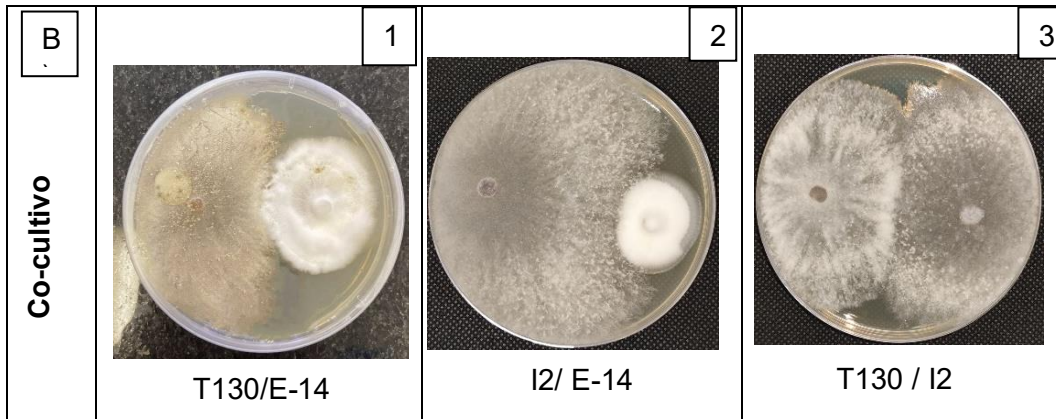


Figura 1: Patrón de crecimiento de *Umbelopsis* sp. (E-14), *M. importuna* (I2) y *M. tridentina* (T130) donde **A)** monocultivo y **B)** co-cultivo, se utilizaron placas con PDA y se evaluó a los 10 días de incubación a 24 °C. Las fotografías de cada hongo son en las placas Petri por el frente.

6.2 Producción de ácido indol acético por las cepas en monocultivo y co-cultivo

La evaluación de ácido indolacético (Fig. 2) en los diferentes tratamientos (monocultivo y co-cultivo) dio como resultado que la cepa I2 destacó con la mayor producción de AIA, alcanzando ($82 \mu\text{g mL}^{-1}$) en monocultivo. Sin embargo, al ser cultivada en consorcio con otras especies, se observó una notable disminución en la producción de fitohormonas siendo ocho veces menor al estar en un co-cultivo fúngico con otra especie como E-14, durante este consorcio se alcanzó una producción más baja de todos los tratamientos ($9.68 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Por otro lado, la cepa T130 fue la que tuvo menor producción de AIA en monocultivo ($6.75 \mu\text{g mL}^{-1}$) sin diferencias significativas ($P > 0.05$) con el monocultivo de E-14 ($11.45 \mu\text{g mL}^{-1}$), sin embargo, el consorcio de estas dos especies incremento cinco veces la producción de ácido indol acético alcanzando un valor de ($25.68 \mu\text{g mL}^{-1}$), este mismo comportamiento se evidencio en el co-cultivo fúngico entre I2 y T130 donde a pesar de que la cepa I2 disminuyo su producción en monocultivo provoco un aumento de nueve veces la producción de T130 por si sola alcanzando una concentración de ($48.6 \mu\text{g mL}^{-1}$).

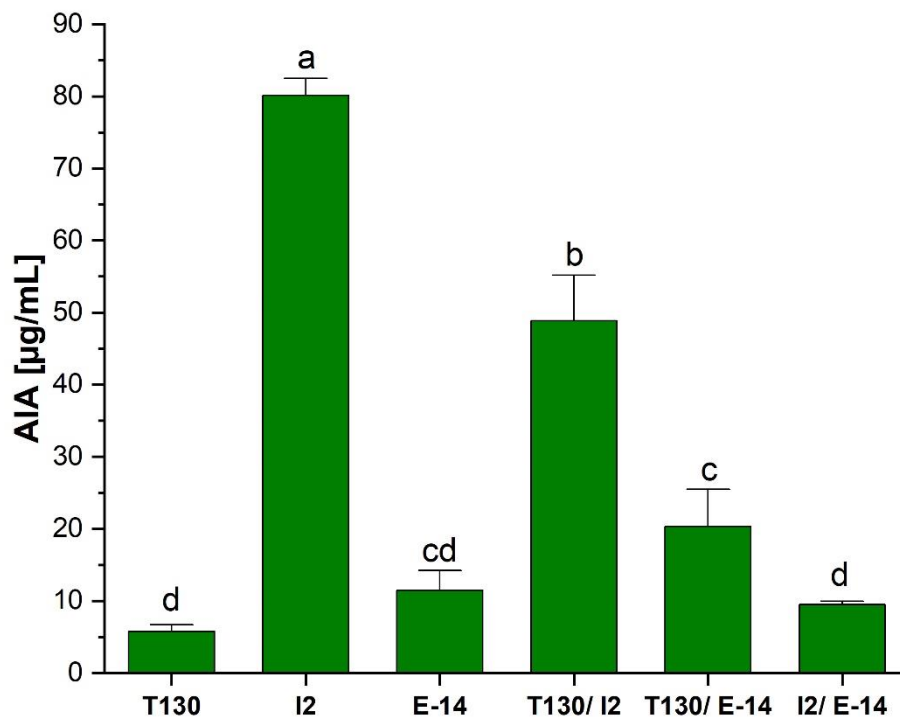


Figura 2: Concentración de AIA en µg/mL por las distintas cepas en monocultivo y co-cultivo. Los gráficos muestran la desviación estándar de un n = 3 y las letras representan las diferencias significativas entre tratamientos con un P<0.05 (Anova, Test Tukey).

6.3 Cromatografía de capa fina (CCF) de los tres co-cultivos fúngicos en comparación a un control comercial

Los resultados de CCF se pueden observar (Fig. 3) donde de izquierda a derecha se encuentran los extractos de co-cultivos (E-14/T130); (E-14/I2); (T130/I2); (AIA comercial). Las muestras se dejaron correr hasta una distancia de 7 cm de disolvente, durante un periodo de 20 minutos. Antes de aplicar la solución reveladora (Fig. 3A) no se mostraba algún tipo de coloración en la placa, una vez que se sumergió en la solución (Fig. 3B) todos los co-cultivos fúngicos y el control

de hormona comercial mostraron coloración roja, y rosada con Rf 0.95;0.57 respectivamente. En (I2/T130) y el stock de hormona comercial se pudo identificar una línea amarilla con un Rf de 0.59

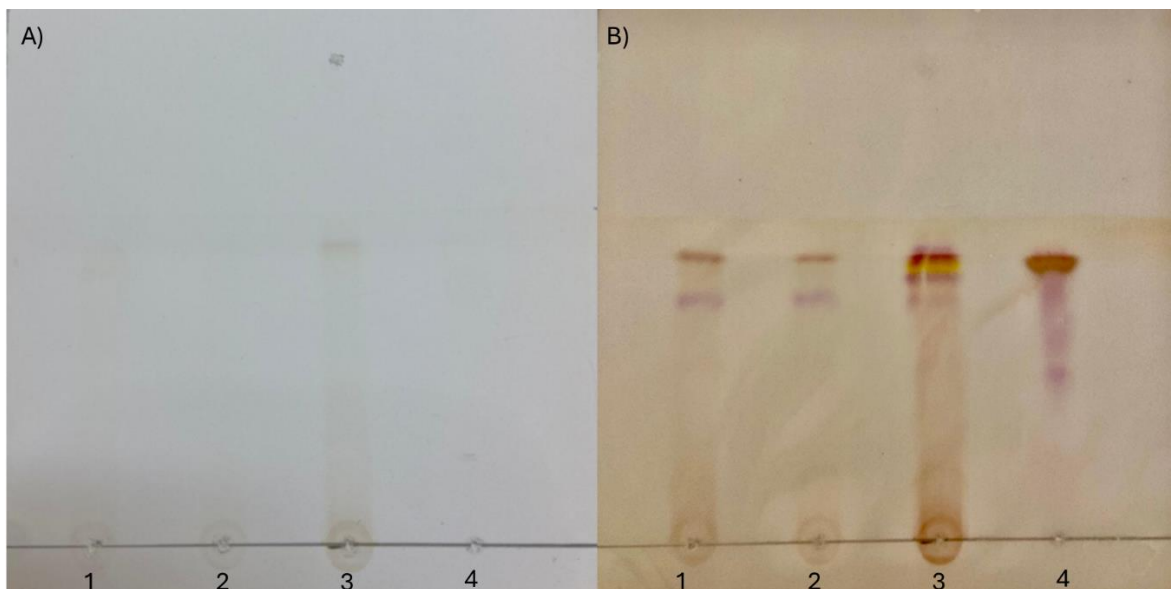


Figura 3: Cromatografía de capa fina (CCF) de ácido indol acético de los tres co-cultivos fúngicos y un control comercial donde de izquierda a derecha se encuentran los extractos de co-cultivos (**1:**E-14/130T); (**2:** E-14/I2); (**3:** 130T/I2); (**4:** AIA comercial). **A)** sin solución reveladora. **B)** placa sumergida en solución reveladora.

6.4 Producción de ácido giberélico por las diferentes cepas en monocultivo y co-cultivo

Los análisis de concentración de ácido giberélico (GA), secretados por diversas cepas de hongos en monocultivo (Fig. 4), mostraron una producción que osciló entre 1,3 y 4,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La cepa T130 destacó por su mayor producción, alcanzando 4,23 $\mu\text{g}/\text{mL}$; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los monocultivos. Por otro lado, el hongo endófito E-14 presentó una producción inferior

en comparación con las otras especies, con un total de 1,22 $\mu\text{g/mL}$. En los co-cultivos fúngicos, T130/I2 mostraron una secreción de la fitohormona estudiada que fue 15,81 veces superior al monocultivo de *M. tridentina* y 72,5 veces mayor que la del monocultivo de *M. importuna*, siendo también estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en comparación con el resto de los co-cultivos analizados. La interacción entre las dos especies de *Morchella* y el hongo endófito *Umbelopsis* produjo valores estadísticamente similares, pero con una producción superior a la observada en los monocultivos. Esto sugiere una sinergia en la estimulación de la fitohormona en todos los co-cultivos evaluados

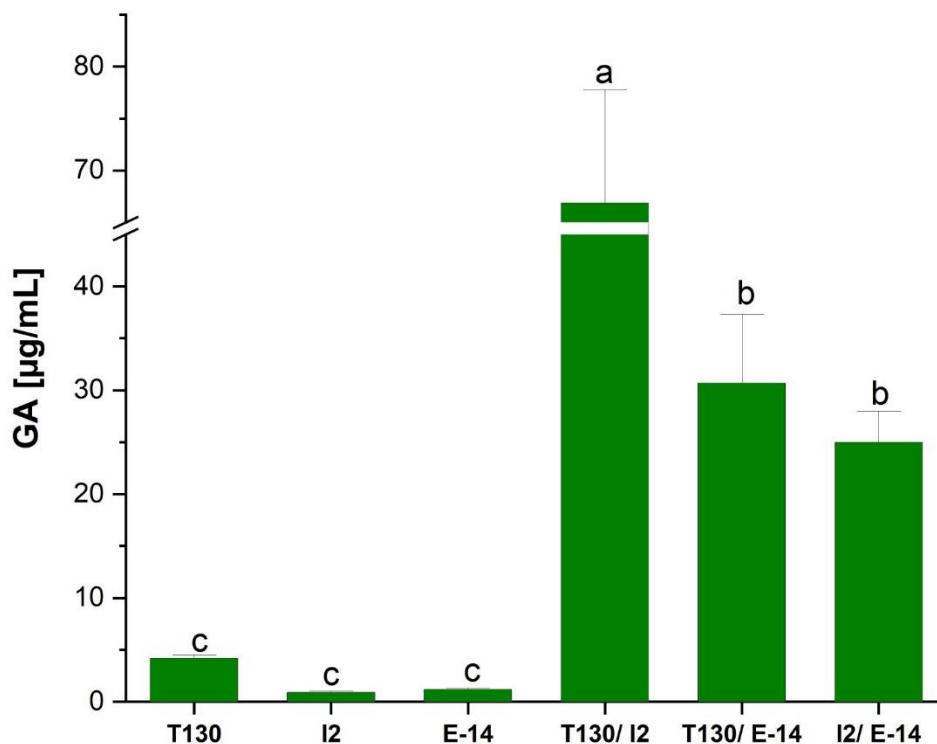


Figura 4: Concentración de Ácido giberélico en $\mu\text{g/mL}$ por las distintas cepas en monocultivo y co-cultivo. Los gráficos muestran la desviación estándar de un $n = 3$ y las letras representan las diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (Anova, Test Tukey).

6.3 Cromatografía de capa fina (CCF) de los tres co-cultivos fúngicos en comparación a un control comercial de ácido giberélico (GA3)

Como se puede observar (Fig 5b) la cromatografía de capa fina utilizando como control un stock de ácido giberélico GA3 mostro un Rf de 0,48 que se presentó en los tres co-cultivos y en la hormona comercial. Una vez secada la placa con la solución reveladora (Fig. 5a) se puede identificar que la intensidad de la banda en el co-cultivo (E-14/I2) es más tenue que las anteriores (ver flecha), pero aun así se posiciona en el Rf del stock comercial, además se ven diferentes tipos de solutos en Rf de 0.35 y 0,4 (no caracterizados en este trabajo) que no se asocian al control de hormona comercial, pero que se encuentran presentes en los co-cultivos fúngicos y que se pueden visualizar bajo luz UV.

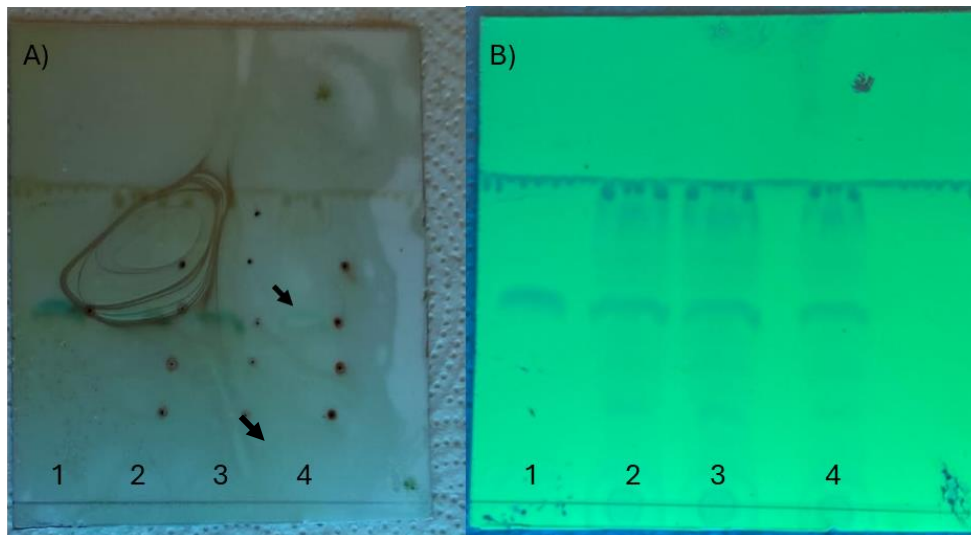


Figura 5: Cromatografía de capa fina (CCF) de Ácido giberélico GA3 de los tres co-cultivos fúngicos y un control comercial donde de izquierda a derecha se encuentra. **A)** placa sin solución reveladora. **B)** placa con solución reveladora expuesta a luz UV. (1: GA3 comercial); (2: I2/T130); (3: E-14/T130) y (4: E-14/I2).

6.5 Efecto del ácido giberélico (GA₃) sobre el porcentaje de germinación *in vitro*

El porcentaje de germinación (Fig. 6A) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, a excepción del medio suplementado con la hormona comercial GA3, que presentó un bajo porcentaje de germinación del 50%, en comparación con el 70% esperado según la calidad de las semillas. Tanto el tratamiento control negativo como los tres co-cultivos fúngicos alcanzaron una germinación del 70%.

En cuanto al índice de vigor longitud de germinación (Fig. 6B), el tratamiento de control tuvo el menor desarrollo junto con los co-cultivo (E-14/I2) y (E-14/T130), sin presentar diferencias significativas entre ellos. El tratamiento con mayor desarrollo fue (I2/T130) seguido del tratamiento con hormonas comerciales.

El índice de vigor basado en el peso de la plántula (Fig. 6C) mostró una diferencia estadísticamente significativa en el co-cultivo (I2/T130). Estos resultados se reflejan en las diferencias de biomasa y tejido radicular de *Solanum lycopersicum* (Fig. 6D). El co-cultivo (I2/T130) mostró el mayor crecimiento y desarrollo entre todos los tratamientos, seguido del tratamiento con hormona comercial. A pesar de que este último presentó un menor porcentaje de germinación, el desarrollo de plántulas fue superior al observado en los tratamientos (E-14/I2) y (E-14/T130).

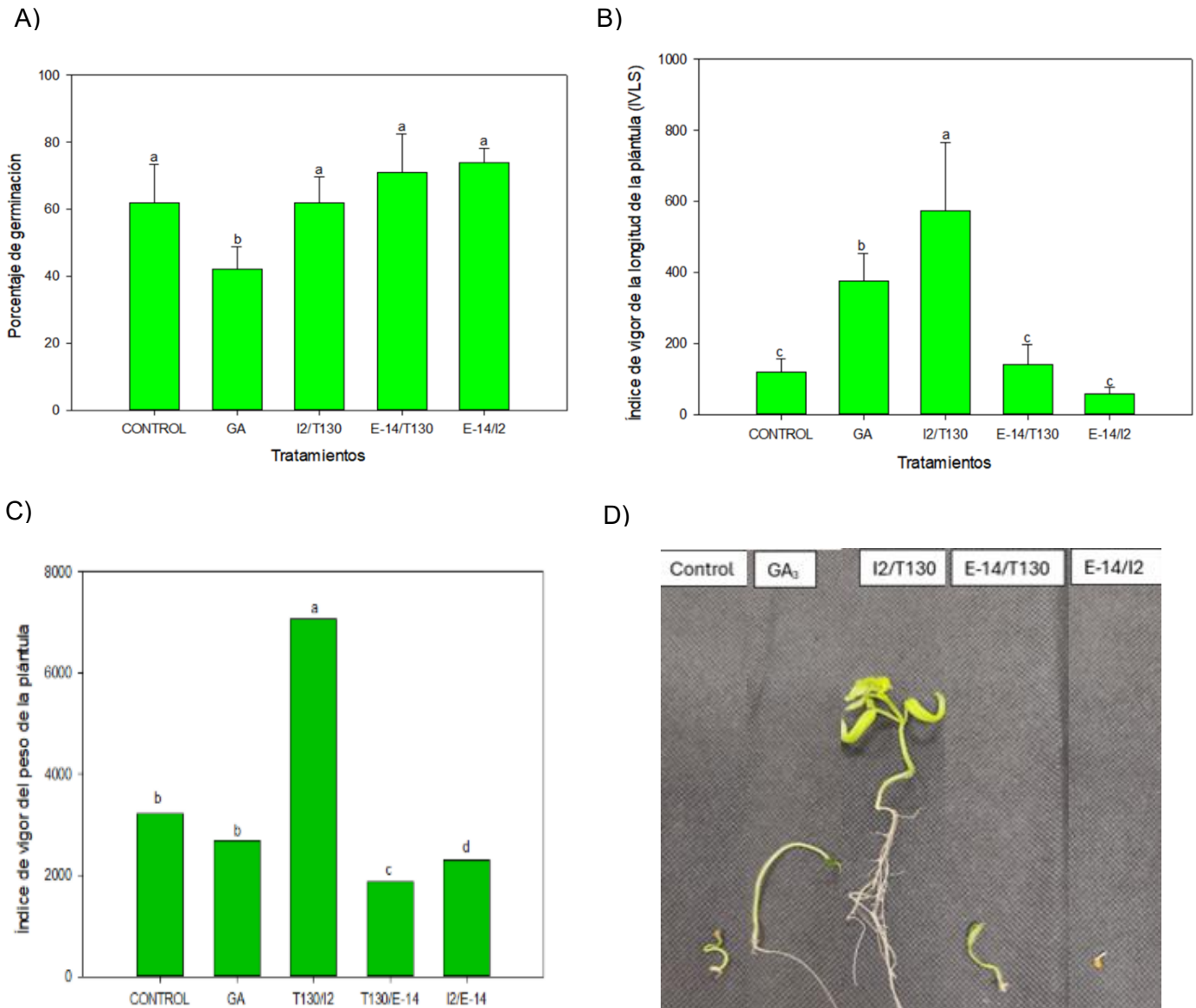


Figura 6: Efecto del Ácido giberélico (GA) en la germinación *in-vitro* de *Solanum lycopersicum* en medio de cultivo MS luego de 30 días, donde control: medio MS sin GA; GA: Ácido giberélico comercial; T130/I2: Extracto de *M.tridentina*/*M. importuna*; T130/E-14: Extracto de *M. tridentina*/*Umbelopsis* sp.; I2/E-14: Extracto *M.importuna*/*Umbelopsis* sp. **A)** Porcentaje de germinación (%), **B)** vigor del alto de germinación, **C)** índice del vigor del peso de la plántula, **D)** plantas de *Solanum lycopersicum* de los diferentes tratamientos. las letras representan las diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (Anova, Test Tukey).

6.6 Evaluación de caldos de cultivo fúngicos en crecimiento y cambios morfológicos de *Solanum lycopersicum*

Pasados los 45 días de cultivo se realizó una cosecha destructiva con las plantas más representativas de cada tratamiento (Fig. 9). La biomasa aérea y radicular (Fig. 7) tuvo mayor resultado para los tratamientos (T2 y T4), presentando diferencias significativas con todos los demás tratamientos. Los menores valores de biomasa radical y aérea se presentaron con el tratamiento T6.

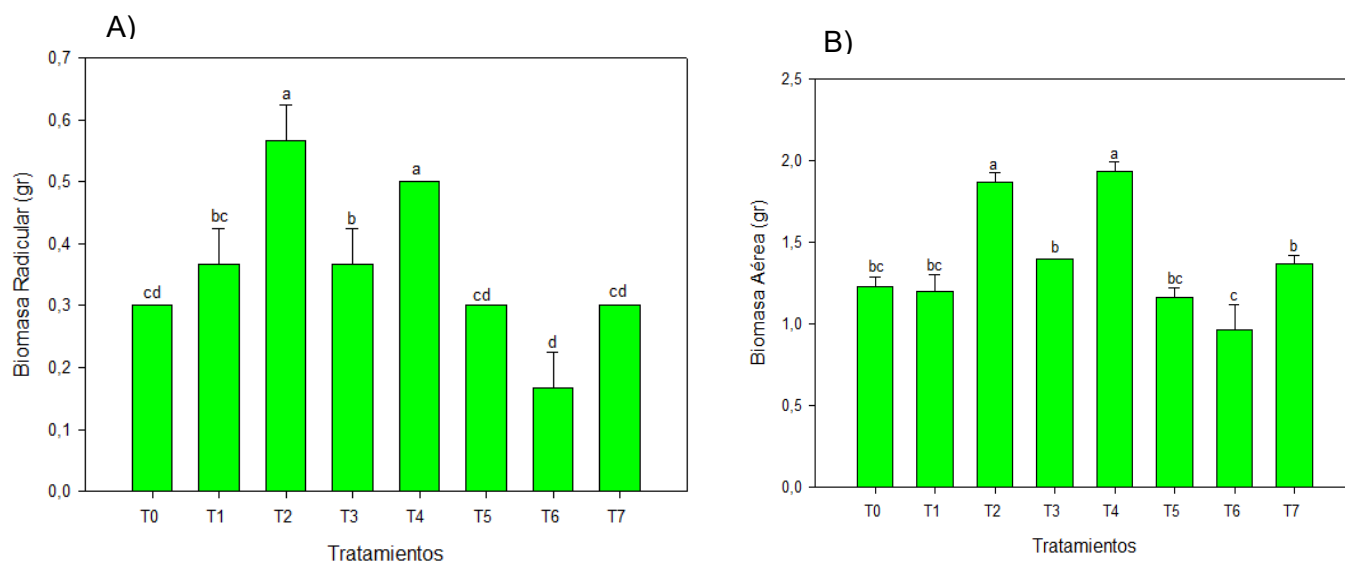


Figura 7: Análisis morfológicos de plantas de *Solanum lycopersicum* luego de 45 días de cultivo en condiciones de invernadero, para los código de los tratamientos ver tabla 2. **A)** Biomasa radicular en (g); **B)** Biomasa aérea en (g). Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (Anova, Test Tukey).

El largo de tallo (Fig. 8A) no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos (T2, T3, T4, T5) con un promedio de 24 cm de largo. El tratamiento con mayor largo y desarrollo fue T1 con un promedio de 28.7 cm, además los tratamientos con menor longitud de tallo fueron los inóculos fúngicos (T6 y T7) incluso con menor longitud al control T0. El DAC (Fig. 8B) no mostró diferencias significativas entre tratamientos y el menor diámetro de tallo al igual que la longitud obtuvo uno un tratamiento de inóculo T7. En cuanto al número de hojas (Fig. 8C)

T1 y T3 tuvieron la mayor cantidad mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos, los co-cultivos fúngicos (T2, T3 y T4) tuvieron mayor producción de hojas en comparación a los inóculos fúngicos (T6 y T7). El largo de raíz (Fig. 8D) mostró diferencias significativas en comparación al control T0, y T1, T2 y T3 tuvieron un promedio de 34 cm, los tratamientos (T4, T5 y T6) no mostraron diferencias significativas entre sí y tuvieron un promedio de 28 cm, nuevamente el inóculo (T7) tuvo el menor desarrollo de longitud de raíz en comparación a todos los otros tratamientos con 17 cm.

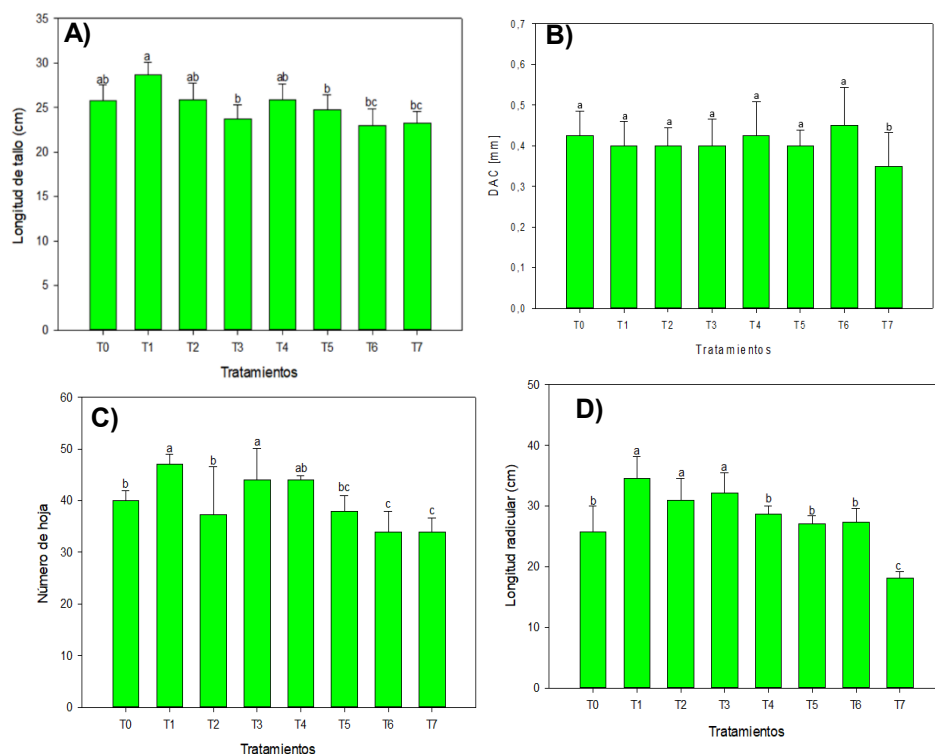


Figura 8: Análisis morfológicos de plantas de *Solanum lycopersicum* luego de 45 días de cultivo en condiciones de invernadero, para los código de los tratamientos ver tabla 2.. **A)** Longitud del tallo (cm); **B)** Diámetro de altura de cuello (DAC) (mm); **C)** Número de hojas; **D)** Longitud radicular. Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (Anova, Test Tukey).



Figura 9: Plantas de *Solanum lycopersicum* seleccionadas de forma representativa por tratamiento luego de 45 días de cultivo en condiciones de invernadero, para los códigos de los tratamientos ver tabla 2.

6.6 Evaluación de caldos de cultivo fúngicos en cambios fisiológicos de *Solanum lycopersicum*

Como se puede observar (Fig. 10A). La clorofila relativa mostro una diferencia significativa entre el tratamiento con hormonas comerciales (T1) y el resto de los tratamientos. Tratamientos T2, T3 y T4, no mostraron diferencias significativas entre sí, ni tampoco con el control (T0), el único tratamiento con baja producción de clorofila relativa fue T6?T5 siendo 1,75 veces menor a (T1). El índice de performance (Fig. 10B) los tratamientos (T3 y T4) mostraron mayor Pi cercanos a 2,5 el doble del tratamiento control T0 y los tratamientos con inóculos (T6 y T7). En relación con Fv/Fm (Figura 10 C) todos los tratamientos estuvieron por sobre los 0,75 y no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

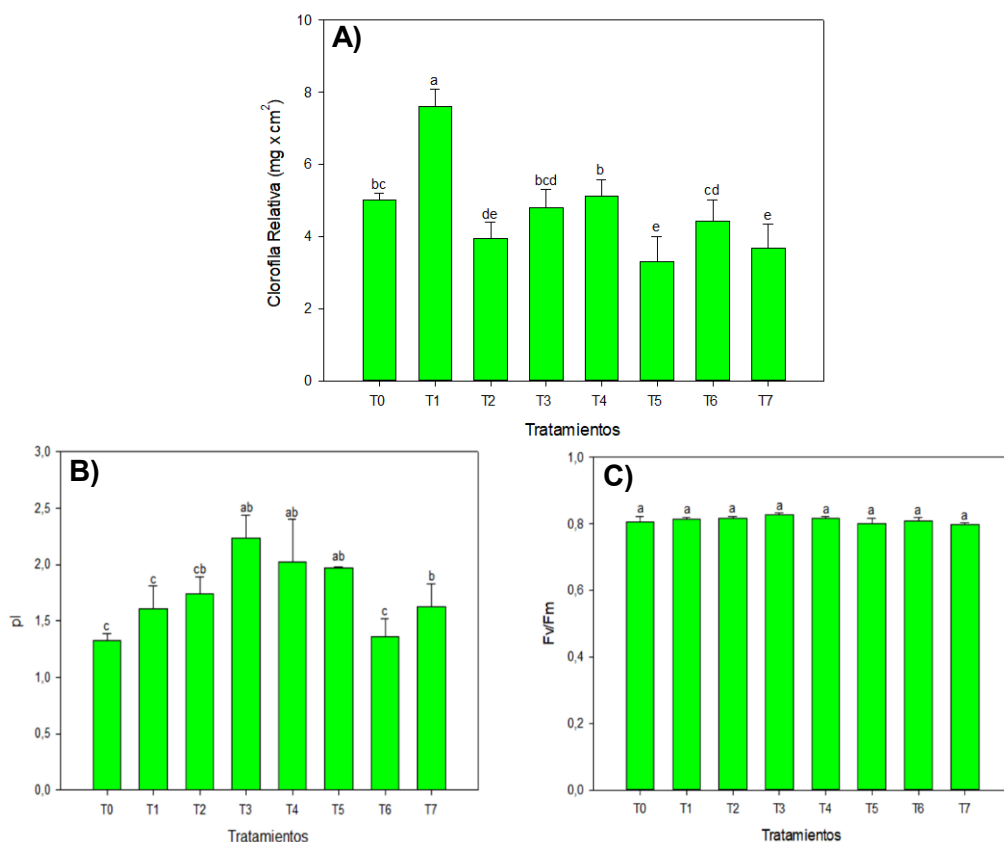


Figura 10: Cambios fisiológicos en plantas de *Solanum lycopersicum* luego de 45 días de cultivo en condiciones de invernadero donde **A)** Clorofila relativa [mg x cm²]. **B)** índice de performance **C)** Fv/Fm. para los

código de los tratamientos ver tabla 2. Las letras representan las diferencias significativas entre tratamientos con un $P < 0.05$ (Anova, Test Tukey).

6.7 Evaluación de pigmentos fotosintéticos en hojas de *Solanum lycopersicum*

Los resultados del análisis de pigmentos fotosintéticos (Tabla 3) en las plantas de tomate muestran diferencias significativas entre los tratamientos. En cuanto a la clorofila a, el tratamiento T4 presentó el mayor contenido (9,21 mg), significativamente superior a los tratamientos (T5, T3, T6 y T7), que mostraron valores bajos (1,16 a 2,57 mg). Para la clorofila b, el tratamiento T1 destacó con un contenido de 13,30 mg, siendo significativamente mayor que todos los demás tratamientos, mientras que T4 tuvo un valor intermedio (9,42 mg) sin diferencias significativas con T0 (6,26 mg). En el caso de los carotenoides, el tratamiento T6 obtuvo el contenido más alto (19,02 mg), superando significativamente a todos los demás tratamientos, excepto a T5 y T7, que también mostraron valores elevados (17,58 y 15,82 mg, respectivamente). Por otro lado, el tratamiento control T0 presentó el menor contenido de carotenoides (1,30 mg), clorofila a y b.

Tabla 3: Pigmentos fotosintéticos de hojas de *S. lycopersicum*, para los códigos de los tratamientos ver tabla 2.

Tratamiento	Clorofila a (mg)	Clorofila b (mg)	Carotenoides (mg)
T0	4,00 ± 4,12 (bc)	6,26 ± 5,21 (bc)	1,30 ± 1,15 (d)
T1	6,73 ± 2,11 (ab)	13,30 ± 3,15 (a)	9,60 ± 7,41 (cd)
T2	6,07 ± 2,80 (ab)	3,66 ± 4,08 (c)	16,27 ± 1,67 (ab)
T3	1,61 ± 1,18 (c)	0,42 ± 0,48 (c)	13,18 ± 10,39 (bc)
T4	9,21 ± 3,87 (a)	9,42 ± 2,40 (ab)	6,20 ± 7,80 (cd)
T5	1,91 ± 0,75 (c)	1,47 ± 0,30 (c)	17,58 ± 1,21 (ab)
T6	1,16 ± 0,15 (c)	1,04 ± 0,08 (c)	19,02 ± 0,27 (a)
T7	2,57 ± 0,58 (c)	2,35 ± 1,52 (c)	15,82 ± 3,85 (ab)

Finalmente se realizó un análisis de componentes principales, el PCA indicó que el CP 1 explica en un 43,3% y el CP 2 en un 25,3 %, explicando en dos componentes un 68,6 % la variabilidad total de los datos. El análisis multivariado mostró que entre las variables evaluadas el tratamiento T1 (hormona comercial) presentó los mejores resultados en cuanto con Altura (cm), DAC (mm), clorofila relativa (mg x cm²), clorofila a y b, sin embargo, T2, T3 y T4 (hormonas producidas en co-cultivo fúngico) presentaron los mejores resultados en cuanto a biomasa aérea, radicular, y parámetros fisiológicos (Fv/Fm; pl). Se pudo corroborar que T5, T6 y T7, presentaron menores valores de biomasa Fv/Fm, LR y n° hojas

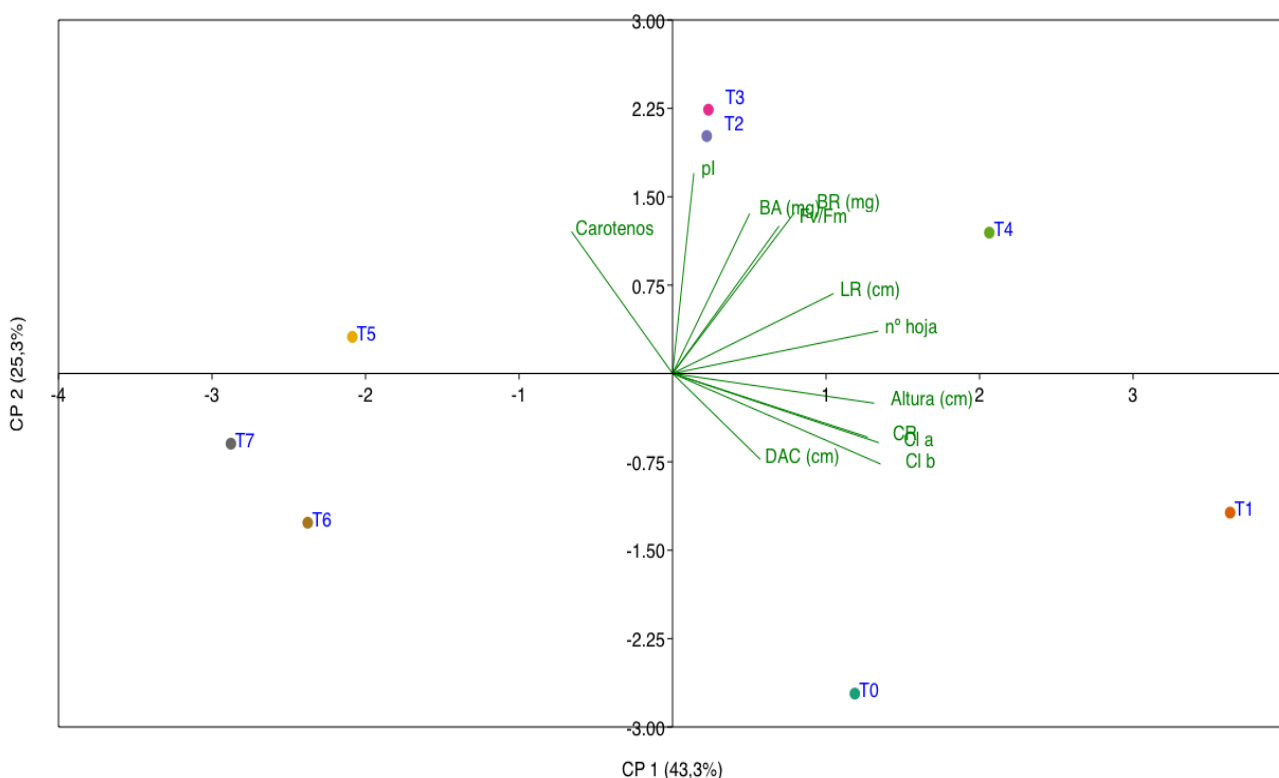


Figura 11. Análisis de componentes principales (PCA) de los diferentes tratamientos (T0-T7) y las características morfofisiológicas de plantas de *Solanum lycopersicum*. BA: biomasa aérea; BR: Biomasa radical; LR: longitud radicular; Cl a y b: Clorofila a y b; DAC: diámetro a la altura del cuello; Fv/Fm = Relación entre la fluorescencia variable (Fv) y la fluorescencia máxima (Fm); pl: Eficiencia cuántica del fotosistema.

7 Discusión

El presente estudio se enfocó en los co-cultivo fúngico entre dos géneros (*Morchella* y *Umbelopsis*), ambos capaces de generar compuestos promotores del crecimiento vegetal, como solubilizadores de fosfato, fitohormonas y sideróforos, según estudios previos (Arroyo 2023; Diaz-Valenzuela et al. 2024). En los ensayos de dualidad se observó un crecimiento entrelazado sin la presencia de bloques de inhibición ni pigmentación en la unión de los micelios según la metodología descrita por Molla et al.(2001), lo cual indica que no hubo un fenómeno competitivo por espacio entre especies (Boddy & Hiscox, 2016) ni tampoco la liberación de compuestos inhibitorios de crecimiento o defensa (Arias, 2024).

El género *Morchella* ha sido documentado en diversas regiones, y en Chile se han encontrado especies en bosques nativos de *Nothofagus* en la Patagonia (Machuca et al., 2021), así como también en plantaciones forestales del centro-sur del país que han sufrido daños por incendios o cosechas (Arroyo, 2023; Sanz et al. 2023). A su vez el género *Umbelopsis* es un hongo endófito aislado de raíces de *Araucaria araucana* (Chávez et al., 2023), una especie emblemática de Chile. Al igual que las especies del género *Morchella* es común encontrar este tipo de endófito y hongos saprofitos en terrenos que han experimentado perturbaciones debido a incendios (Sukdeo et al., 2019). Estas dos especies de hongos demostraron en el ensayo realizado de dualidad que no se inhiben entre si e incluso pueden asociarse, dado que comparten características similares de sustrato y condiciones de crecimiento.

El AIA es la fitohormona encargada de la elongación, división celular y se centra en la generación de raíces (Noa, 2024), principalmente, el crecimiento de raíces secundarias y pelos radiculares (García et al., 2024). Al determinar la producción de auxinas se demostró que todas las cepas tienen la capacidad de producir fitohormonas del tipo auxinas y lo realizan mediante la vía de producción dependiente del precursor triptófano. Las cepas de *Morchella* utilizadas (*M. tridentina* y *M. importuna*) y el hongo endófito (*Umbelopsis* spp.) tienen la capacidad de producir fitohormonas y compuestos que promueven el crecimiento vegetal en

monocultivo (Arroyo, 2023; Diaz-Valenzuela, 2024). *Morchella tridentina* y *Umbelopsis* sp tuvieron un aumento en la producción de fitohormona al utilizar la técnica de co-cultivo en comparación a la técnica tradicional de monocultivo. La cepa *M. importuna* disminuyó la producción de AIA en todos los co-cultivos en comparación a su monocultivo, esta cepa ha mostrado una significativa capacidad de producir fitohormonas y compuestos que pueden promover el crecimiento vegetal de manera individual. En investigaciones previas, se reportó una producción de 80 µg/ml para esta misma especie (Arroyo, 2023), valor cercano al obtenido en el presente estudio durante el monocultivo, tal como se observar en la Fig. 2. No obstante, no fue posible potenciar esta característica a través de co-cultivos fúngicos. Una posible limitante para la potenciación en co-cultivo está relacionada a la concentración de triptófano disponible, así como la capacidad de absorción de este precursor por el hongo dominante. Dado que *M. importuna* ha demostrado ser un hongo de crecimiento rápido e invasivo, estudios anteriores han evidenciado un incremento significativo en el crecimiento de biomasa y efectos notables en los azúcares reductores, alcanzando su punto máximo a los 10 días en monocultivo (Cuevas, 2023). En un esquema de co-cultivo, este crecimiento podría verse restringido por la presencia del otro microorganismo, ya que, aunque no se observe competencia o inhibición directa entre las especies, ambas consumen los mismos nutrientes del medio de cultivo y el precursor de fitohormonas del tipo auxina.

En cuanto al ácido giberelico estas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular y alargamiento de las plantas, además, interfieren en la germinación y maduración de las plantas (Ramírez et al., 2024). Los resultados de este estudio mostraron una producción máxima por la cepa *M. tridentina* de 4,23 µg/mL en monocultivo, sin diferencias significativas con las otras cepas en monocultivo. En un estudio realizado en cinco cepas de *Trichoderma* sp. en monocultivo se midió la capacidad de generar fitohormonas vegetales, entre ellas se evaluó el ácido giberelico GA3 las diferentes cepas no mostraron diferencias significativas entre ellas y la de mayor producción fue de 2,78 µg/ mL (López-Valenzuela et al., 2022). En otras especies de hongos (Rademacher y Graebe 1979) comprobó que el hongo

patógeno *Sphaceloma manihoticola* producía considerables cantidades de GA en cultivos alcanzando concentraciones de 20 mg L⁻¹ de medio.

El co-cultivo fúngico entre especies mostró un significativo aumento en la concentración de GA en los caldos de cultivo. El máximo obtenido tuvo una producción de 65 µg/ mL por las cepas de *Morchella* (I2/T130), además, el resto de co-cultivos igualmente mostró un aumento en la producción (Fig. 4). Ayesteran (2006) evaluó la producción de GAs por el hongo *Gibberella fujikoro* y sugiere que para un mejor rendimiento en la producción de ácido giberélico el pH debe ser ácido (pH 4.0), además, cuando la fuente de nitrógeno del medio se agota, el crecimiento del hongo decae y la producción de metabolitos secundarios se incrementa (Cuali-Álvarez et al. 2011). En este estudio se utilizó medio de cultivo PD el cual es considerado el óptimo para realizar ensayos de co-cultivos fúngicos (Xu et al., 2023). En este medio se encuentran los dos tipos de hongos compartiendo espacio y nutrientes, generando un agotamiento de este último, lo que se traduce en un ambiente óptimo para el aumento en la producción de las fitohormonas GAs en comparación al monocultivo. Además, las especies de *Morchella* principalmente *M. importuna* se ha registrado en estudios anteriores con la capacidad de acidificar medios de cultivos con el paso de los días (Cuevas, 2023). debido a estas dos importantes características se pudo obtener un aumento en la producción de giberelinas en los tres tipos de co-cultivos. Utilizando este método de detección solo se puede cuantificar la cantidad total de esta fitohormona pero no se puede identificar ni purificar de manera exacta el tipo de giberelina en específico, estas se dividen en dos grupos, las de 19 carbonos que se consideren GAs bioactivas como fitohormonas y las de 20 carbonos las cuales son precursoras de las anteriores (Ponce, 2008).

Para poder identificar el tipo de fitohormona cuantificada en los caldos de cultivos se deben realizar metodologías de separación como cromatografías líquida de alta eficiencia (HPLC) (no considerados en este estudio). Sin embargo se utilizó la técnica de cromatografía de capa fina (CCF) la cual es una técnica de separación y análisis de muchos compuestos y de acuerdo con estos se utilizan solventes

específicos mediante migración diferencial a través de un lecho plano de una fase estacionaria, con la fase móvil fluyendo por fuerzas capilares (Vargas, 2023). Es una técnica que tiene un margen de error y las varianzas en el factor de retención pueden deberse al tiempo de la solución reveladora, tipo de placa, solventes utilizados, etc. (Vargas, 2024). En este ensayo la placa de cromatografía para determinar la presencia de ácido indol acético mostro una coloración esperada en los tonos morados-rosado con un Rf de 0,56. La distancia coincide con el del control comercial y el color es el característico en presencia de Salkoski como solución reveladora y características que se presentan como una mancha amarilla con fucsia (Celis et al., 2008). El ácido indol acético se ha presentado en Rf que oscilan entre 0,50 y 0,79 (Castillo et al ., 2007 ; Cuevas, 2014;) con esto se puede confirmar la presencia de la fitohormona AIA en los extractos fúngicos, además, la línea amarilla sobre el Rf de ácido indol acético se ha mostrado en estudios anteriores como acido-indol propiónico y acido indol butirico (Delgado et al., 2007), este compuesto que se evidencio en el co-cultivo (i2/T130) tiene una similitud funcional y estructural con el ácido indol acético (Castillo et al ., 2005).

La identificación de ácido giberelico del tipo GA3 se comprobó que los tres co-cultivos tenían presencia de esta fitohormona al compararla con el stock, al igual que con otro tipo de componentes que se presentaron en la cromatografía, los cuales podrían asociarse a otros tipos de giberelinas precursoras en estudios anteriores se ha identificado la presencia de GA3 con un Rf de 0,44 y que fue confirmada con un stock comercial (Diaz et al., 2013), las marcas visualizadas en la placa cromatográfica se asociarían a giberelinas precursoras o de otro tipo, en estudios anteriores donde se ha evaluado la presencia de giberelinas GAs en extractos y caldos de cultivo se obtuvo patrones de GA3 y GA1 con Rf similares a los obtenidos en este estudio (Delgado et al ., 2007)

Los bioensayos realizados a semillas y plantas *Solanum lycopersicum* tuvieron la finalidad de evaluar de manera morfológica y fisiológica la actividad promotora del crecimiento vegetal de los extractos y caldos de co-cultivos fúngicos en comparación a las hormonas comerciales existentes en el mercado. El bioensayo

utilizado para determinar la capacidad de promover la germinación en *Solanum lycopersicum* demostró que a pesar de que el porcentaje de germinación fue igual al indicado por el proveedor y no haber diferencias significativas ($P > 0,05$) en el porcentaje de germinación entre el control y los co-cultivos si hubo una gran diferencia en el vigor del alto y peso del germinado que determina la capacidad de germinar y formar plántulas funcionales (Ramirez, 2021), principalmente en co.cultivo de las especies de *Morchella* el cual aumento el peso y alto en 1,75 veces a las de los otros tratamientos incluyendo el de la hormona comercial GA3. El uso de fitohormonas giberelinas en la etapa de germinación rompe la latencia de las semillas aumentando la el porcentaje de germinación además se muestran características específicas en el uso de esta fitohormona ya que se puede observar en la apariencia de los germinados que el correspondiente al co- cultivo (I2/ T130) (Fig.7D) corresponde al comportamiento de semillas expuestas a fitohormonas GAs durante la germinación el cual esta descrito en la literatura como el desarrollo de plantas con alargamiento del hipocótilo (Pizarro et al.,2023; Kucera et al ., 2005 ; Loayzal et al ., 2023).

En relación con los bioensayos realizados a plantas en condiciones de invernadero se evaluó la morfología las hormonas tipo auxinas tienen la capacidad de aumentar la longitud de raíces y de planta en general (Khan et al ., 2013) los análisis morfológicos demostraron que utilizando caldos de cultivo de microorganismos se puede potenciar el crecimiento vegetal. Existen varios estudios sobre la promoción de crecimiento en plantas de *S. lycopersicum* en uno de ellos se utilizaron caldos de hongos de la especie *Aspergillus* en monocultivo con una producción de (9,03 $\mu\text{g/ml}$) y se estableció que sin importar que exista y se pueda medir la producción de AIA mediante técnicas de colorimetría y cromatografía no todos los hongos tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal (Baez, 2024) durante este ensayo todos los tratamientos se ajustaron a la menor concentración obtenida en los co-cultivos (9,56 $\mu\text{g/ml}$) que fue el tratamiento 3. Sin embargo los tres co-cultivos se comportaron de manera similar y lograron potenciar el crecimiento vegetal tanto radicular como aéreo con diferencias significativas al control T0 y mostrando una tendencia similar al tratamiento con hormonas comerciales. T1 Los tratamientos con

inoculos fúngicos mostraron menor actividad promotora reflejada en los parámetros morfológicos y fisiológicos, esto se puede atribuir al poco tiempo de duración de los ensayos (40 días), considerando que los inoculantes biológicos pasan por una etapa de adaptación posterior a la inoculación y a la especificidad Planta-hongo (Antunes et al., 2008; Petigrosso et al., 2022)

Finalmente el análisis fisiológicos para poder evaluar la calidad y estado de la planta, esto mediante la relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (F_v/F_m) que permite establecer si las plantas están estresadas dependiendo de su valor que oscila entre 0,75 y 0,85 en plantas normales (Björkman & Demmig, 1987) durante este estudio ninguno de los tratamientos mostro un valor inferior a 0.75 debido a esto se infiere que las plantas no pasaron por un estrés biotico ni abiotico durante la duración del bioensayo además esta relación y el índice de potencial fotosintético (PI_{abs}) son por lo tanto indicadores indirectos del rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII) (Rodriguez et al ., 2014). El parámetro pl refleja cambios en el fotosistema I (PSI) y se utiliza para identificar si se sufrió sequía y cuál es la tolerancia del fotosistema de la planta a la sequía las plantas expuestas a los diferentes tratamientos no tuvieron variaciones en el PI y no presentaron características relacionadas a algún tipo de estrés o daño en el fotosistema I, ya que ningún tratamiento tuvo un pl menor a 0,5 e incluso los tratamientos con caldos de co-cultivos se mantuvieron por sobre el valor 1 lo que indica una eficiencia del fotosistema y buen estado fisiológico de la planta (Rodríguez et al ., 2021). Estos indicadores al igual que los pigmentos fotosintéticos como la clorofila, los carotenoides, las xantofilas y flavonoides proporciona información sobre el rendimiento fisiológico de la planta tienen un papel vital en la captura de energía de la luz, que se convierte en energía química (Vicente-Juan et al., 2021)

8 Conclusiones

- La técnica de co-cultivo fúngico se presenta como una herramienta valiosa para la producción de fitohormonas y compuestos que no dependen directamente de un precursor específico. Este enfoque resulta óptimo para la síntesis de giberelinas; sin embargo, puede ser menos favorable para la producción de fitohormonas del tipo auxinas.
- La aplicación de giberelinas de extractos fúngicos demuestra un mayor impacto en el desarrollo del hipocótilo que en el porcentaje de germinación.
- Los caldos resultantes de co-cultivos fúngicos exhiben una actividad promotora del crecimiento superior en comparación con el inóculo de las mismas especies fúngicas, lo que resalta la sinergia existente entre las especies en condiciones de co-cultivo.
- El co-cultivo entre (T130/I2) muestra una notable capacidad para promover el crecimiento vegetal tanto en etapas de germinación *in vitro* como en condiciones controladas de invernadero (biomasa aérea y radicular), lo que indica su potencial para futuras aplicaciones
- Se rechaza la primera hipótesis, dado que el co-cultivo fúngico entre las especies *Morchella* y *Umbelopsis* no siempre resulta en una mayor producción de fitohormonas en comparación con el monocultivo.
- Se acepta la segunda hipótesis, ya que las fitohormonas producidas durante el co-cultivo demuestran una promoción del crecimiento vegetal en plantas de *Solanum lycopersicum*, mayoritariamente bajo condiciones *in vitro*.

REFERENCIAS

- Acuña JJ, 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. *J Soil Sci Plant Nutr* **11**(3):1–12. doi:10.4067/S0718-95162011000300001.
- Adedayo AA, Babalola OO. (2023). Fungi that promote plant growth in the rhizosphere boost crop growth. *J Fungi* **9**(2):239. doi:10.3390/jof9020239.
- Aghai M, Khan Z, Joseph M, Stoda A, Sher A, Doty SL. (2019). The effect of microbial endophyte consortia on *Pseudotsuga menziesii* and *Thuja plicata* survival, growth, and physiology across edaphic gradients. *Front Microbiol* **10**:1353. doi:10.3389/fmicb.2019.01353.
- Alcántara-Cortés JS, Acero Godoy J, Alcántara Cortés JD, Sánchez Mora RM. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova* **17**(32):109–129.
- Aloui H, Souguir M, Hannachi C. (2014). Determination of an optimal priming duration and concentration protocol for pepper seeds (*Capsicum annuum* L.). *Acta Agric Slov* **103**(2):213–221. doi:10.14720/aas.2014.103.2.6.
- Alvarado-Castillo G, Benítez-Badillo G, Mata G. (2015). Inoculación *in situ* de *Morchella*: primer registro de su obtención en México. *Madera Bosques* **21**(3):129–135.
- Tripathy A, Rath CC. (2020). Endophytic fungi from *Oryza sativa* L.: Isolation, characterization, and production of GA3 in submerged fermentation. *Int J Curr Microbiol App Sci* **9**(11):1007–1020. doi:10.20546/ijcmas.2020.911.119.
- Anchal, T., & Chandi, C. R. (2020). Endophytic fungi from *Oryza sativa* L.: Isolation, characterization, and production of GA3 in submerged fermentation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **9**(11), 1007-1020. doi:10.20546/ijcmas.2020.911.119

- Andrade Ayala MDCN, Hernández Castillo FDC, Laredo Alcalá EI, Ledezma Pérez AS, Alvarado Canché CN, Romero García J. (2020). Efecto biológico de nanopartículas cargadas con ácido indolacético microbiano sobre los parámetros morfométricos del tomate. *Rev Mex Cienc Agríc* 11(3):507–517.
- Antunes PM, Miller J, Carvalho LM, Klironomos JN, Newman JA. (2008). Even after death the endophytic fungus of *Schedonorus phoenix* reduces the arbuscular mycorrhizas of other plants. *Funct Ecol* 22:912–918.
- Anupama N, Murali M, Sudisha J, Amruthesh KN. (2014). Crude oligosaccharides from *Alternaria solani* with *Bacillus subtilis* enhance defense activity and induce resistance against early blight disease of tomato. *Asian J Sci Technol* 5(7):412–416.
- Añez-Lara P, Gutiérrez-Ramírez L. (2020). Determinación del potencial de promoción de crecimiento de plantas por *Pseudomonas fluorescens* mediante análisis de laboratorio. [Tesis]. Universidad de Santander.
- Aquino MD, Saparrat MCN, Pildain MB. (2023). *Umbelopsis* (Mucoromycota) from Patagonia, Argentina: identification, phylogenetic analysis, and expression profiling of lipase activity and lipid accumulation in selected isolates. *Mycol Prog* 22. doi:10.1007/s11557-023-01846-7.
- Arias B. (2024). Producción y caracterización de las enzimas lignocelulolíticas del hongo de pudrición blanca de la madera *Bjerkandera adusta* en cocultivo con el hongo de pudrición parda *Gloeophyllum trabeum* [tesis]. Universidad de Concepción.
- Aroca R, Irigoyen J, Sanchez M. (2001). Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity. *Plant Sci* 161:719–726.
- Arroyo, M. (2023). Actividad promotora del crecimiento vegetal de especies de *Morchella* provenientes de bosque nativo y de plantaciones forestales del centro-sur de Chile [Tesis]. Universidad de Concepción. Recuperado de <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/10725>

- Baez Castro C. (2024). Producción de metabolitos de hongos endófitos de cactus (*Stenocereus* sp.) y evaluación de su capacidad de promoción de crecimiento en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*). [Tesis]. Universidad de los Andes.
- Báez-Pérez A, González-Molina L, Solís Moya E, Bautista-Cruz A, Bernal-Alarcón MADLA. (2015). Efecto de la aplicación del ácido indol-3-butírico en la producción y calidad de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Rev Mex Cienc Agríc* 6(3):523–537.
- Banda Gutiérrez A. (2024). Uso de hongos endófitos aislados de teocintle del Balsas (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) para mejorar las condiciones de cultivo de variedades comerciales de maíz (*Zea mays*). [Tesis]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Barcia B. (2020). Evaluación de diferentes dosis de la citocinina BAP en la propagación *in vitro* de *Vanilla tahitensis*. [Tesis]. Universidad de Guayaquil.
- Barquero LC. (2024). Incremento de la fijación biológica de nitrógeno y el crecimiento de la soya (*Glycine max*) mediante el uso de hongos solubilizadores de fósforo. *Agron Costarric* Advance Access. doi:10.15517/rac.v48i1.59136.
- Bhattacharyya PN, Jha DK. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28(4):1327–1350.
- Björkman O, Demmig B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170(4):489–504. doi:10.1007/BF00402983.
- Boddy L, Hiscox J. (2016). Fungal ecology: principles and mechanisms of colonization and competition by saprotrophic fungi. *Microbiol Spectr* 4(6):4–6.
- Brayan NHJ. (2024). Efecto de ácido indolacético y bencilaminopurina en la germinación y desarrollo *in vitro* de *Epidendrum dichotomum* C.Presl. Ayacucho - 2021. [Tesis]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. <https://repositorio.unsch.edu.pe/items/b946b083-e32e-400c-a1f1-d07ee634498a>
- Caballero Briones DL. (2023). Efecto del tiempo de inmersión en ácido giberélico sobre la germinación y desarrollo de plántulas de papaya (*Carica papaya*), variedad Maradol roja, en vivero.

- Cango Y, Chusin D. (2024). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). [Tesis]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/11706>
- Cano MA. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp., y *Pseudomonas* spp.: Una revisión. *Rev U.D.C.A Actual Divulg Cient* 14(2):15–31.
- Castillo G, Ortega G, Carabeo V, Delgado G, Michelena G. (2007). Determinación cualitativa de giberelinas y auxinas por cromatografía de capa fina. *ICIDCA* 41(1):12–17.
- Castillo G, Altuna B, Michelena G, Sánchez Bravo J, Acosta Echevarría M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *An Biol* 27.
- Celis LX, Gallardo IR. (2008). Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. [Tesis]. <http://hdl.handle.net/10554/8948>
- 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. *For Ecol Manag* 458:117806. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117806>
- Chávez D, Rivas G, Machuca Á, Santos C, Deramond C, Aroca R, Cornejo P. (2023). Contribution of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi to drought tolerance in *Araucaria araucana* seedlings. *Plants* 12:2116. <https://doi.org/10.3390/plants12112116>
- Cuali-Álvarez I, Pavón-Romero SH, Colín-Cruz A. (2011). Producción de ácido giberélico a partir de *Gibberella fujikuroi* utilizando lodo residual municipal como sustrato. *Univ Sci* 16(1):51–62. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832011000100004&lng=en

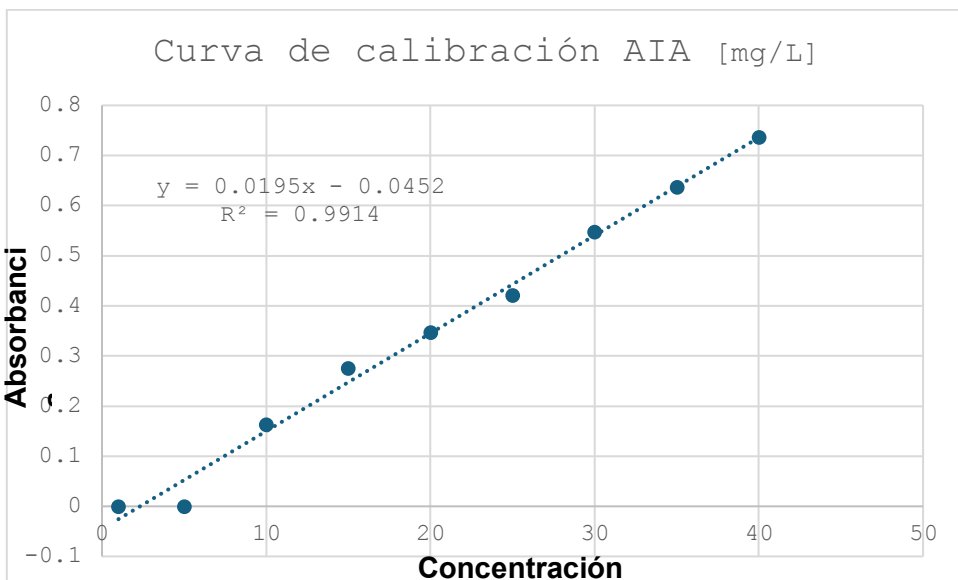
- Cuevas González ELY. (2014). Producción de auxinas por bacterias solubilizadoras de fósforo. [Tesis]. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Cuevas F. (2023). Caracterización del crecimiento y actividad biológica de especies de *Morchella* del centro-sur de Chile cultivadas por fermentación en estado líquido. [Tesis]. Universidad de Concepción. <https://repositorio.udec.cl/handle/11594/10724>
- Dahlstrom J, Smith J, Weber N. (2000). Mycorrhiza-like interaction by *Morchella* with species of the Pinaceae in pure culture synthesis. *Mycorrhiza* 9:279–285. <https://doi.org/10.1007/PL00009992>
- Delgado G, Carabeo V, Castillo G, Ortega G, Michelena G. (2007). Determinación cualitativa de giberelinas y auxinas por cromatografía de capa fina. *ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 41(1):12–17. <https://www.redalyc.org/articuloa?id=223114967002>
- Díaz-Valenzuela C, Deramond-Gálvez C, Machuca Á, Chávez D. (2024). Actividad promotora del crecimiento vegetal de cuatro hongos endófitos aislados desde *Araucaria araucana*. *Siembra* 11(2):e6802. <https://doi.org/10.29166/siembra.v11i2.6802>
- Díaz LE, Henao A, Ramírez LA. (2013). Residuo agrícola de cebolla larga como fuente de ácido giberélico. *Rev U.D.C.A Act Divulg Cient* 16(2):369–377. <https://doi.org/10.31910/rudca.v16.n2.2013.909>
- EI-Nwehy SS, Afify RRM. (2023). Utilization of gibberellic acid (GA3) and mepoquat chloride (MC) as growth regulators on maize to alleviate salinity stress. *SABRAO J Breed Genet* 55(5):1654–1665.
- Flores-Córdova MA, Matas M, Pérez S, Rodríguez M, Salas N, Soto M, Sánchez-Chávez E. (2023). *Trichoderma* fungi as an agricultural biological control in Mexico. *Rev Chapingo Ser Horti* 29:79–114.
- García V, Luz S. (2024). Papel fisiológico de *Azotobacter nigricans* en la aplicación de un biosólido en suelo agrícola para la producción de maíz. [Tesis]. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/5165>

- Ghimire R, Yadav PK, Khanal S, Shrestha AK, Devkota AR, Shrestha J. (2021). Effect of different levels of gibberellic acid and kinetin on quality and self-life of banana (*Musa* spp.) fruits. *Heliyon* 7(9):e07828.
- Ghodrat V, Moradshahi A, Rousta MJ, Karampour A. (2013). Improving yield and yield components of rice (*Oryza sativa* L.) by indolebutyric acid (IBA), gibberellic acid (GA3) and salicylic acid (SA) pre-sowing seed treatments. *Am-Eurasian J Agric Environ Sci* 13(6):872–876.
- Glickmann E, Dessaux Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61(2):793–796.
- González Ortega-Villaizán A, King E, Patel MK, Pollmann S. (2024). Plant hormone crosstalk under abiotic stress conditions. In: Lüttge U, Cánovas FM, Risueño Almeida MC, Leuschner C, Pretzsch H, editors. *Progress in Botany*. Vol 85. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/124_2024_80
- Gutiérrez Cárdenas OG, Cortez Madrigal H, Garzón A. (2024). Uso e impacto de hongos entomopatógenos endofíticos: Su potencial en el contexto de la sostenibilidad agrícola. *Biotecnia* 26:e1986. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v26.1986>
- Hasan HA. (2002). Gibberellin and auxin-indole production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. *Acta Microbiol Immunol Hung* 49(1):105–118.
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158(1):17–25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Heydariyan, M., Basirani, N., Sharifi-Rad, M., Khmmari, S., & Poor, S. R. (2014). Effect of seed priming on germination and seedling growth of the caper (*Capparis Spinosa*) under drought stress. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(8), 2381–2389.

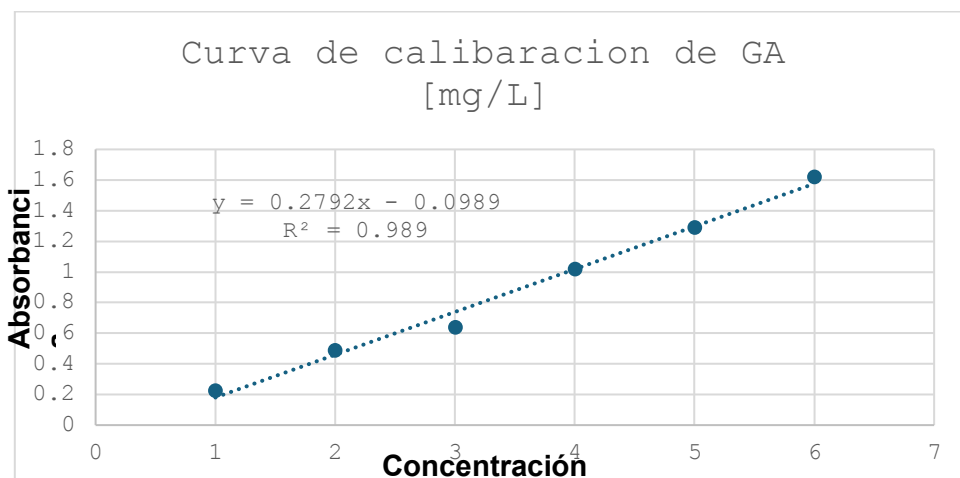
- Hoffman, M. T., Gunatilaka, M. K., Wijeratne, K., Gunatilaka, L., & Arnold, A. E. (2013). Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. *PLoS One*, 8(9), e73132.
- Hu, J., Wei, Z., Friman, V. P., Gu, S. H., Wang, X. F., Eisenhauer, N., et al. (2016). Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression. *MBio*, 7(6), e01534-16.
- Khan, M. I. R., & Khan, N. A. (2013). Role of auxins in plant growth and development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 67, 1–10.
- Kim, R. (2023). Advanced organotypic in vitro model systems for host–microbial coculture. *BioChip Journal*, 17, 147–173. <https://doi.org/10.1007/s13206-023-00103-5>
- Kucera, B., Cohn, M. A., & Leubner-Metzger, G. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15(4), 281–307. <https://doi.org/10.1079/SSR2005218>
- Landero Vargas, G. (2024). Validación del método de identificación del producto fitoterapéutico café de brusca por cromatografía en capa fina (TLC) para evaluar su estabilidad [Tesis]. Universidad de Córdoba.
- Lichtenthaler, H. K., Karunen, P., & Grumbach, K. H. (1977). Determination of prenylquinones in green photosynthetically active moss and liver moss tissues. *Physiologia Plantarum*, 40(2), 105–110.
- Liu, W., He, P., Shi, X., Zhang, Y., Perez-Moreno, J., & Yu, F. (2023). Large-scale field cultivation of *Morchella* and relevance of basic knowledge for its steady production. *Journal of Fungi*, 9(8), 855.
- Loayza, A. P., García-Guzmán, P., Carozzi-Figueroa, G., & Carvajal, D. E. (2023). Dormancy-break and germination requirements for seeds of the threatened Austral papaya (*Carica chilensis*). *Scientific Reports*, 13(1), 17358. <https://www.nature.com/articles/s41598-023-44386-y>

- Jordan Pacsi RK (2024) Efecto de la interacción fitohormonal (AIB, AG3 y BAP) y el bioestimulante Agrispon en la producción de forraje verde hidropónico de “cebada” *Hordeum vulgare* L. y “trigo” *Triticum aestivum* L., en condiciones de invernadero – Arequipa. [Tesis], Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12773/17962>
- Vargas, G. (2024). Validación del método de identificación del producto fitoterapéutico café de brusca por cromatografía en capa fina (TLC) para evaluar su estabilidad. [Tesis]; Universidad de Córdoba. Disponible en: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/8121>
- Wen, J., Okyere, S.K., Wang, S., Wang, J., Xie, L., Ran, Y., and Hu, Y. (2022). Endophytic Fungi: An Effective Alternative Source of Plant-Derived Bioactive Compounds for Pharmacological Studies. *J. Fungi*, 8(2): 205. <https://doi.org/10.3390/jof8020205>.
- Xu, C. (2014). Umbelopsis dimorpha and application of Umbelopsis dimorpha in promoting growth and improving drought resistance of *Dendrobium officinale*. Patente de China, N.º CN104195054A. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/CN104195054A/e>
- Zambrano-Arteaga, J. C., Hoyos-Sanchez, R. A., and Chicaiza-Finley, D. (2022). Evaluación de la germinación de semillas de palma de iraca (*Carludovica palmata*) en condiciones in vitro y ex vitro. *Caldasia*, 44(2): 221-230.
- Zhu, Y., Zhang, J., Gao, X., Shen, Y., Qin, L., and Zhu, B. (2024). Metabolites from a co-culture of *Trichoderma yunnanense* and *Paenibacillus peoriae* improve resistance to corm rot disease in *Crocus sativus*. *Industrial Crops and Products*, 213: 118465. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118465>.

Anexos



Anexo 1: Curva de calibración ácido indol acético



Anexo 2: Curva de calibración Ácido giberélico