

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Escuela Superior de Apan

## TESIS DE LICENCIATURA

**Bioprospección de capacidades fisiológicas en micromicetos nativos de México**

**Para obtener el título de**  
Licenciado en Ingeniería en Biociencias

## PRESENTA

Erick Ramón Domínguez Barrera

## Directora

Dra. Gabriela Patricia Heredia Abarca

## Codirectora

Dra. Teresa Romero Cortes

Apan, Hgo., México a 30 de octubre de 2025.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Escuela Superior de Apan  
Campus Apan

Número de control: ESAP-014/2025  
Asunto: Autorización de impresión de tesis

Erick Ramón Domínguez Barrera  
P.D.L.I.B.C.  
**PRESENTE**

Por este medio le comunico que, el jurado asignado al pasante de la Licenciatura en Ingeniería en Biociencias **Erick Ramón Domínguez Barrera (421423)**, a quienes les presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título **"Bioprospección de capacidades fisiológicas en micromicetos nativos de México"**, después de la revisión ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

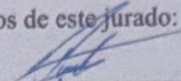
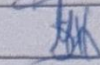
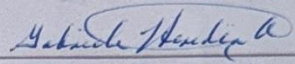
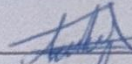
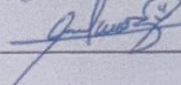
PRESIDENTE: Dr. Pablo Antonio López Pérez

SECRETARIO: Dra. Sonia Herrera Monroy

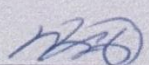
PRIMER VOCAL: Dra. Gabriela Patricia Heredia Abarca

SEGUNDO VOCAL: Dra. Teresa Romero Cortes

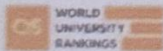
SUPLENTE: Dra. Mónica Ivette Sánchez Contreras

ATENTAMENTE  
"Amor, Orden y Progreso"  
Chimalpa, Apan, Hgo., México a 30 de octubre de 2025.

  
Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros  
Coordinadora de Ingeniería en Biociencias

"Amor, Orden y Progreso"



2025



Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa  
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900  
Teléfono: 7717172000 Ext. 50901  
esap@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Escuela Superior de Apan

Bioprospección de capacidades fisiológicas en micromicetos nativos de México

Tesis

Para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en Biociencias

Presenta

Erick Ramón Domínguez Barrera

Directora

Dra. Gabriela Patricia Heredia Abarca

Codirectora

Dra. Teresa Romero Cortes

Apan, Hgo., México a 30 de octubre de 2025.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Diversidad de Micromicetos perteneciente al Instituto de Ecología A. C. (INECOL), bajo la dirección de Dra. Gabriela Heredia Abarca y codirección de Dra. Teresa Romero Cortes.

Este trabajo fue financiado por recursos del Instituto de Ecología A. C. (INECOL).

## DEDICATORIA

A Dios, quien me ha permitido existir, descubrir un mundo lleno de infinitas posibilidades y quien nunca me ha soltado la mano en este camino.

A mis papás, Juanita y Roberto, quienes han sido pilares y faros en este recorrido, gracias por creer en mí, por enseñarme a luchar por mis metas y no darme por vencido ante los obstáculos. Son y siempre serán mi ejemplo, nunca habrá palabras suficientes para expresar mi agradecimiento y amor hacia ustedes.

A mis hermanos, Lupita y Beto, es un orgullo el crecer con ustedes. Gracias por cuidarme, quererme y demostrarme que, aunque la vida no es fácil siempre debemos mantener nuestras ideas, principios, esperanza en el corazón y vivir con la frente en alto.

A Vero, Martita, Lore y Abraham, por llenarme de cariño desde mis primeros días hasta hoy. Agradezco los hermosos momentos que hemos pasado como familia, gracias por siempre motivarme y creer en mí. Tienen todo mi cariño sin importar la distancia.

A todas y todos los que ahora son estrellas y brillan en el cielo, mi amor eterno para ustedes.

Para el Erick de ayer, de hoy y de mañana, por no rendirse, por perseguir sus metas y convicciones.

En esta tesis entrego una parte de mí, para todas y todos quienes me han acompañado en diferentes momentos; instantes que han construido parte de mi ser.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Gabriela Heredia Abarca, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme el gran privilegio de adentrarme en el fascinante mundo de los hongos microscópicos. Agradezco profundamente su apoyo, confianza, dedicación y respaldo, los cuales han sido fundamentales para mi formación académica y personal. Desarrollarme científicamente dentro de su equipo de trabajo ha marcado un antes y un después en mi vida profesional, por lo cual estaré siempre agradecido.

A la Dra. Teresa Romero Cortés, al Dr. Pablo Antonio López Pérez y a la Dra. Mónica Ivette Sánchez Contreras, quienes no solo me brindaron valiosas herramientas académicas para mi desarrollo profesional, sino que también impulsaron mi interés por aprender y superarme. Agradezco sinceramente las atenciones y el apoyo que siempre mostraron hacia mi persona.

A la Dra. Sonia Herrera Monroy y al Dr. Juan Manuel Rivera Ramírez, por su apoyo incondicional, por enseñarme a cuestionar el mundo, a formar mi criterio propio y a creer en mí. Gracias por brindarme su valiosa amistad y por enseñarme a valorarme tanto en lo académico como en lo personal.

Al Dr. Randy Ortiz Castro, por brindarme la oportunidad de realizar parte de este trabajo en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, así como por compartir sus conocimientos para el establecimiento de la interacción hongo-planta y proporcionar el material y equipo necesarios.

A la Dra. Edith Jiménez Muñoz por su motivación y consejos, así como a todas y todos los docentes de la Escuela Superior de Apan que han estado presentes en mi educación.

A todas y todos quienes me han brindado su amistad a lo largo de mi recorrido universitario y laboral, entre Hidalgo y Veracruz. Sus consejos y muestras de cariño quedarán siempre grabados en mí.

## RESUMEN

Los hongos microscópicos son microorganismos eucariontes ampliamente diversos y distribuidos en prácticamente todo el planeta. Tienen una gran importancia ecológica al participar en diversos procesos biológicos y biogeoquímicos. Su complejo metabolismo les confiere múltiples capacidades fisiológicas, lo que los convierte en un foco de interés dentro de las investigaciones científicas, por sintetizar una fuente de moléculas con aplicaciones en industrias como la papelera, farmacéutica, agrícola y alimentaria, entre otras. La creciente necesidad de desarrollar tecnologías sostenibles y respetuosas con el medio ambiente ha impulsado en el ámbito científico y tecnológico el interés para aprovechar estos microorganismos con potencial biotecnológico. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo conocer y comparar las capacidades fisiológicas de micromicetos saprobios y endófitos nativos de México mediante la evaluación de su actividad enzimática, solubilización de fósforo y promoción del crecimiento vegetal *in vitro*.

Las evaluaciones se efectuaron en 45 cepas; 27 de micromicetos saprobios y 18 de endófitos, todos ellos aislados de diferentes regiones de México. Para las pruebas enzimáticas cualitativas correspondientes a celulasa, lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa se emplearon medios sólidos reveladores. La prueba cuantitativa de lacasa se realizó mediante espectrofotometría. Para valorar la solubilización de fósforo se empleó en forma sólida y líquida el medio revelador Sundara, cualificándose mediante la medición de halos y por espectrofotometría. De los resultados de las evaluaciones fueron seleccionadas cinco cepas: *Cladosporium* sp. (7ER), *Arthrinium* sp. (41RC), *Gonatobotryum apiculatum* (H105), *Parascedosporium putredinis* (H113) y *Pestalotiopsis* sp. (SPC1) a las cuales se les realizó la valoración de su efecto *in vitro* sobre el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Los resultados mostraron que todas las cepas presentaron al menos una respuesta positiva a las enzimas probadas. La actividad celulasa estuvo presente en el 80% de las cepas, seguida de la lignina peroxidasa (66.6%), lacasa (44.4%) y manganeso

peroxidasa (6.66%). Las cepas *Cerisporiopsis subvermispota* (E220), *Myrmecridium schulzeri* (E215) y *Neopestalotiopsis* sp. (E201) mostraron buena actividad enzimática celulasa y lignina peroxidasa en la evaluación cualitativa. En la evaluación cuantitativa de la actividad lacasa, se corroboró el potencial de *Cerisporiopsis subvermispota* (E220). En cuanto a la actividad para la solubilización de fósforo (SF), poco más de la mitad de las cepas formaron un halo de solubilización, siendo las cepas *Cladosporium* sp. (7ER), *Gonatobotryum apiculatum* (H105) y *Parascedosporium putredinis* (H113) las que mostraron una mejor respuesta a la evaluación cualitativa de SF, destacando las cepas H105 y H113, por sus mayores concentraciones de fósforo soluble en la evaluación cuantitativa.

Con respecto a la actividad promotora del crecimiento vegetal, las cinco cepas seleccionadas provocaron reducción en la longitud de la raíz primaria. *Pestalotiopsis* sp. (SPC1) generó un efecto de inhibición sobre la punta de la raíz primaria provocando una curvatura en sentido contrario a la inoculación del hongo, mientras que las cepas *Arthrinium* sp (41RC) y *Cladosporium* sp. (7ER) provocaron el mayor efecto de promoción del crecimiento vegetal al generar una alta inducción de raíces laterales y un incremento significativo del peso foliar.

Los resultados de este estudio ponen sobre relieve la importancia de explorar hongos con diferentes formas de vida; de las especies estudiadas las cepas endófitas tuvieron mayor respuesta a la actividad enzimática mientras que las saprobias presentaron mejores resultados en la solubilización de fósforo. Estos estudios son clave para comprender la capacidad fisiológica y el potencial biotecnológico de los hongos microscópicos. El aprovechamiento de los hongos nativos de nuestro país requiere tanto del fortalecimiento de ceparios con aislamientos de distintos ambientes y formas de vida, como del desarrollo de investigaciones interdisciplinarias que integren el conocimiento ecológico, taxonómico, fisiológico, bioquímico y biotecnológico de estos organismos.



## ABSTRACT

The micromycetes are microscopic eukaryotes distributed all around the globe, they hold a great ecological significance due to their role in diverse biological and biogeochemical processes. Their complex metabolism and diverse genetics bestow them multiple physiological capabilities, which makes them a focus point in biological investigations because they represent a poorly explored source of bioactive molecules with industrial applications such as paper production, pharmaceuticals, agricultural and food management, among others. The rising need to develop both sustainable and ecofriendly technologies has uplifted the interest in exploiting this microorganism's biotechnological potential. In this context, the present study aimed to understand and compare the physiological capacities of saprobic and endophytic micromycetes native to Mexico by evaluating their enzymatic activity, phosphorus solubilization, and plant growth promotion *in vitro*.

The evaluations were carried out on 45 strains: 27 saprobic micromycetes and 18 endophytes isolated from different regions of Mexico. Solid developer media were used for the qualitative enzymatic tests for cellulase, laccase, manganese peroxidase, and lignin peroxidase. The quantitative laccase test was performed spectrophotometrically. Solid and liquid Sundara developer media was used to assess phosphorus solubilization, and the test was evaluated by halo measurement and spectrophotometry. From the SF results, the following five strains were selected: *Cladosporium* sp. (7ER), *Arthrimum* sp. (41RC), *Gonatobotryum apiculatum* (H105), *Parascedosporium putredinis* (H113) and *Pestalotiopsis* sp. (SPC1) to evaluate *in vitro* their effect on the development of *Arabidopsis thaliana* seedlings.

The results showed that all strains presented at least one positive response to the tested enzymes. Cellulase activity was present in 80% of the strains, followed by lignin peroxidase (66.6%), laccase (44.4%) and manganese peroxidase (6.66%). The

strains *Cerisporiopsis subvermispota* (E220), *Myrmecridium schulzeri* (E215) and *Neopestalotiopsis* sp. (E201) showed good cellulase and lignin peroxidase enzymatic activity in the qualitative evaluation; in the quantitative evaluation of laccase activity, the potential of *Cerisporiopsis subvermispota* (E220) was corroborated. Regarding phosphorus solubilization (SF) activity, just over half of the strains formed a solubilization halo, with *Cladosporium* sp. (7ER), *Gonatobotryum apiculatum* (H105) and *Parascedosporium putredinis* (H113) strains showing the best response to the qualitative evaluation. In this case strains H105 and H113 stand out for their higher concentrations of soluble phosphorus in the quantitative evaluation.

Regarding plant growth promotion activity, the five selected strains caused a reduction in primary root length. *Pestalotiopsis* sp. (SPC1) generated an inhibitory effect on the primary root tip, which developed a curvature in the opposite direction to the fungal inoculation, while the strains *Arthrinium* sp. (41RC) and *Cladosporium* sp. (7ER ER) produced the greatest plant growth promotion effect by generating a high induction of lateral roots and a significant increase in leaf weight.

The results of this study highlight the importance of exploring fungi with different life forms; among the species studied, endophytic strains had a greater response to enzymatic activity, while saprobic strains performed better in phosphorus solubilization. These studies are key to understanding the physiological capacity and biotechnological potential of microscopic fungi. Their utilization requires both the strengthening of strain collections with isolates of micromycetes from different environments of Mexico and life forms, and the development of interdisciplinary research that integrates ecological, taxonomic, physiological, biochemical, and biotechnological knowledge of these organisms.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Hongos productores de enzimas de interés biotecnológico</b>	<b>4</b>
2.1.1. Celulasas	5
2.1.2. Lacasas	7
2.1.3. Lignina peroxidasa	8
2.1.4. Manganese peroxidasa	9
<b>2.2. Hongos promotores de crecimiento vegetal</b>	<b>10</b>
<b>2.3. Hongos solubilizadores de fósforo</b>	<b>12</b>
2.3.1. Ciclo del fósforo	12
2.3.2. Mecanismos de solubilización de fósforo por HSF	14
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>15</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>16</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
5.1. Objetivo general	16
5.2. Objetivos específicos	16
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>17</b>
6.1. Reactivación de cepas de micromicetos	18
6.2. Actividad enzimática	19
6.2.1. Detección cualitativa de la actividad enzimática	19
6.2.2. Evaluación cuantitativa de la actividad lacasa	21
6.3. Actividad solubilizadora de fósforo	23
6.3.1. Detección cualitativa de solubilización de fósforo	23
6.3.2. Evaluación cuantitativa de la solubilización de fósforo	23
6.4. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento vegetal	24
6.4.1. Desinfección y siembra de semillas	25
6.4.2. Inoculación hongo-planta	25
6.4.3. Medición de raíces primarias, conteo de raíces laterales y obtención de peso fresco	27
6.4.4. Concentración de clorofila	28

6.4.5.	Visualización de la expresión de auxinas en <i>A. thaliana</i> línea DR5: GUS	28
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1.	Detección cualitativa de actividad enzimática	30
7.1.1.	Evaluación cuantitativa de la actividad lacasa	39
7.2.	Detección cualitativa de solubilización de fósforo (SF)	39
7.3.	Evaluación cuantitativa de solubilización de fósforo de las cepas con mayor respuesta en prueba cualitativa (SF)	41
7.4.	Evaluación de la actividad promotora de crecimiento vegetal	46
7.4.1.	Arquitectura de la raíz	46
7.4.2.	Biomasa	49
7.4.3.	Visualización de la actividad auxínica	53
8.	CONCLUSIONES	57
9.	REFERENCIAS	59

## 1. INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen uno de los reinos más diversos y abundantes de la Tierra. Se caracterizan por ser organismos eucariontes, cuyas paredes celulares compuestas principalmente por quitina, una nutrición heterótrofa basada en la absorción y la capacidad de reproducirse tanto sexual como asexualmente principalmente mediante esporas (Herrera & Ulloa, 1990).

Dentro del Reino Fungi, más del 60% de las especies corresponden a hongos microscópicos o micromicetos, grupo que engloba a aquellas especies que desarrollan esporóforos (estructuras en donde se forman las esporas) de un tamaño inferior a 1 mm (Gams, 1992). A lo largo del tiempo, estos microorganismos han sido objeto de estudio y asombro debido a sus características morfológicas, genéticas y fisiológicas, las cuales les han conferido una extraordinaria plasticidad en sus roles o formas de vida como saprobios, endófitos y patógenos (Wrzosek et al., 2016). Las especies saprobias son las que colonizan y obtienen nutrientes de la materia orgánica inerte, las endófitas son aquellas que viven dentro de los tejidos de su hospedante sin generar síntomas aparentes, mientras que las parásitas son las especies que infectan y colonizan a un hospedante causando enfermedad o deterioro de este (Walker, 2025).

Las especies saprobias son las más abundantes y diversas, desempeñan un papel clave en los ciclos biogeoquímicos y biológicos, participando en procesos como la descomposición de desechos orgánicos, la liberación y mineralización de nutrientes esenciales (N, P, K, S). Por su parte las especies endófitas forman una estrecha relación con su planta hospedera, participan en la resistencia al estrés abiótico, adquisición de nutrientes, así como en la protección frente a patógenos (Heredia et al., 2008; Walker, 2025).

Las mismas características y capacidades fisiológicas que han permitido su exitoso desarrollo ecológico y adaptación en prácticamente todo el planeta, son también la base de su potencial biotecnológico. Ejemplo de ello es la producción de enzimas extracelulares utilizadas para la degradación de moléculas complejas en estructuras de bajo peso molecular que son absorbidas e incorporadas al metabolismo

de los hongos. Esta notable actividad enzimática ha sido ampliamente estudiada y aprovechada en diversas industrias, como la papelera, textil y farmacéutica, entre otras (Watkinson et al., 2016).

Dentro de este contexto, el uso de los hongos dentro de la agricultura es otra de las áreas de investigación actual con gran importancia, puesto que son una alternativa agroecológica ante el uso de fertilizantes sintéticos (Palacios, 2023). Los hongos promotores de crecimiento vegetal tienden a mejorar la tasa de germinación y el vigor de las semillas, impactan positivamente en el desarrollo de las raíces y aumentan el área foliar y contenido de clorofila. Todo esto es mediado a partir de diversos mecanismos como la síntesis de fitohormonas, producción de compuestos volátiles y sideróforos, así como la solubilización de minerales. Este último mecanismo, en particular, ha captado un notable interés por su potencial aplicación en la agricultura, destacándose la solubilización de fósforo como una de las estrategias más prometedoras para mejorar la disponibilidad de este nutriente esencial en suelos agrícolas deficientes en fósforo (Hossain et al., 2014).

## 2. ANTECEDENTES

Los hongos microscópicos son un grupo diverso con amplia distribución en la naturaleza y en ambientes antropizados. Por sus características fisiológicas, estos organismos son considerados una fuente importante de moléculas con múltiples aplicaciones biotecnológicas. No obstante que aún son un recurso poco explorado, han tenido un impacto significativo en diversas áreas; ejemplo de ello es su contribución en la industria farmacéutica, mediante el desarrollo de nuevos antibióticos, antimicóticos, antivirales y biomoléculas anticancerígenas. En la industria alimentaria, los micromicetos juegan un papel fundamental al ser utilizados en el proceso de fermentación de productos como el pan y bebidas alcohólicas, como el vino y la cerveza, asimismo, están involucrados en la producción de colorantes y como conservadores (Copetti, 2019). En el ámbito agrícola, el estudio de los micromicetos ha permitido el desarrollo de agentes de biocontrol contra plagas y enfermedades, así como biofertilizantes promotores de crecimiento vegetal, mitigadores de estrés abiótico (Meyer et al., 2020; Watkinson et al., 2016).

Más allá de estos campos, los micromicetos tienen aplicaciones en las industrias textil, papelera y de biocombustibles, e incluso en tendencias emergentes, como la biotecnología ambiental, respondiendo así a las problemáticas actuales del planeta (Hyde et al., 2019; Sánchez et al., 2013). Parte de las capacidades asociadas a las especies de micromicetos se deben a su capacidad para producir diversos tipos de enzimas extracelulares, las cuales son liberadas al medio ambiente para degradar los sustratos que colonizan, permitiéndoles así llevar a cabo su nutrición. Debido a esta capacidad, la caracterización y bioprospección de estos microorganismos fúngicos se ha apuntalado como un campo de investigación prometedor, tanto desde el punto de vista industrial como ambiental y agrícola (Peraza et al., 2021). Entre las capacidades fisiológicas de los hongos microscópicos con aplicación ambiental y agrícola están la producción de enzimas, la solubilización de fosfato y la estimulación del crecimiento radicular en las plantas aspectos que son estudiados en el presente trabajo.

## **2.1. Hongos productores de enzimas de interés biotecnológico**

Como organismos heterótrofos, los hongos requieren obtener la energía necesaria para su desarrollo de fuentes nutritivas externas. Los hongos colonizan y penetran muy diversos tipos de materia orgánica o sustratos que pueden ser vivos o inertes, a través de sus hifas, las cuales secretan enzimas que desintegran las macromoléculas, liberando estructuras químicas de bajo peso molecular que el hongo absorbe. Dicho mecanismo involucra tanto la digestión enzimática como la penetración del sustrato mediante estructuras especializadas, lo que permite a estos organismos colonizar una amplia variedad de materiales, desde materia vegetal en descomposición hasta residuos industriales. En la naturaleza, juegan un rol ecológico fundamental en los procesos biogeoquímicos íntimamente relacionados con el reciclaje de nutrientes (Watkinson et al., 2016).

Las enzimas son proteínas especializadas que funcionan como catalizadores de las reacciones químicas que se desarrollan en los seres vivos. Su versatilidad e importancia trascienden el ámbito biológico, ya que se emplean en diversos sectores industriales y actividades productivas (Borkakoti, 2025). Estos catalizadores biológicos pueden obtenerse de animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, debido a la capacidad limitada de las fuentes vegetales y animales para satisfacer la creciente demanda de la industria, se ha prestado gran atención a las fuentes microbianas. Actualmente, el 50% de las enzimas industriales provienen de hongos, el 35% de bacterias, y el 15% de plantas y animales. Las enzimas fúngicas se destacan por diversas ventajas que las convierten en líderes en la industria, tales como: a) su compatibilidad, eficiencia y adecuación para diversas aplicaciones; b) su producción extracelular, lo que simplifica el proceso de extracción durante la purificación; c) el rápido crecimiento de los hongos, lo que permite tiempos de producción más cortos; d) la necesidad de instalaciones reducidas en comparación con las requeridas para la obtención de enzimas de otros orígenes; y e) su mayor potencial de rendimiento en la producción (Deckers et al., 2020).



Dentro del espectro de enzimas producidas por los hongos, se encuentran las enzimas lignocelulolíticas, que juegan un rol fundamental en la naturaleza al ser biocatalizadores que participan en la descomposición de la lignina y los materiales celulósicos, posibilitando el reciclaje de nutrientes en los diversos ecosistemas. Debido a sus múltiples aplicaciones tanto en la industria como en la biotecnología y biorremediación, las celulasas, lacasas y lignina peroxidasas destacan como tres clases de enzimas de gran interés (Kango et al., 2019).

### **2.1.1. Celulasas**

Las celulasas son un grupo complejo de enzimas que pertenecen a la familia de las glicósido-hidrolasas y desempeñan un papel crucial en la hidrólisis de los sustratos celulósicos, convirtiéndolos en productos monoméricos al hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos de la celulosa. Este polisacárido es el principal constituyente de la pared celular de las plantas y el carbohidrato más abundante en la Tierra. Según la clasificación de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), las celulasas se agrupan en tres categorías: 1) endoglucanasas, 2) exoglucanasas o celobiohidrolasas, y 3) celobiosas o  $\beta$ -glucosidasas. Este complejo enzimático actúa sobre diferentes partes de la celulosa, y su acción sinérgica transforma la celulosa en glucosa mediante el proceso de hidrólisis. Las endoglucanasas hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos de manera aleatoria dentro de la cadena de celulosa (generalmente en las regiones amorfas), formando fragmentos de distintos tamaños y con extremos libres. Las celobiohidrolasas actúan progresivamente, descomponiendo los extremos reductores y no reductores de la cadena de polisacáridos para liberar celobiosa, que luego es descompuesta por las  $\beta$ -glucosidasas. Finalmente, las celobiosas o  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan la celobiosa para producir unidades de glucosa (Jayasekara y Ratnayake, 2019).

Con más de tres décadas de presencia en los sectores comerciales, estas enzimas siguen siendo de interés en la academia e industria, pues se posicionan en segundo lugar en el mercado mundial de enzimas industriales. Dentro de los

principales campos industriales en que son usados estos biocatalizadores se encuentran:

-Industria energética: en el uso de celulasas fúngicas con el fin de mejorar la conversión de biomasa para la producción de biobutanol y bioetanol, así como la búsqueda de nuevas enzimas termoestables (Ranganathan et al., 2022; Srivastava et al., 2018)

-Industria textil: las celulasas son ampliamente conocidas en esta industria, su uso inició en la década de 1980. En la actualidad, este sector se encuentra obligado a cambiar sus metodologías convencionales hacia tecnologías más limpias, debido a la contaminación generada, es por ello por lo que el uso de enzimas ha cobrado mayor relevancia. Dentro de los principales usos de las celulasas en la industria textil se encuentran: 1) lavado de mezclilla y obtención de textura y color deseable, reemplazando el uso de productos químicos y piedra pómez, 2) biopulido de telas, para la obtención de una apariencia suave y brillante con un color mejorado. 3) eliminación de impurezas en las fibras de las telas, 4) reducción del exceso de tinte de las telas y 5) tratamiento de lana (Korsa et al., 2023).

-Industria del papel y la pulpa: las celulasas tienen una amplia variedad de aplicaciones en esta industria pues generan una apariencia de limpieza y brillo en los desechos del papel para su reúso, mejora la resistencia del papel, sustituyen los blanqueadores químicos y realizan un tratamiento más amigable con el ambiente, de igual forma el pulpeo asistido con estos biocatalizadores da como resultado una mejor calidad y reduce el consumo de energía de estos procesos. También se utilizan en la fabricación de papel blando como sanitario y papel toalla, cartón biodegradable y actualmente se buscan nuevas alternativas de uso debido a las altas perspectivas de las celulasas dentro de este sector (Singh et al., 2016).

-Industria de bebidas: en la fabricación de cerveza, el uso de celulasas ha demostrado una mejora en la extracción de malta, además de una mayor tasa de fermentación y reducción en la viscosidad del mosto. En la elaboración de vino se ha demostrado que se obtiene un excelente color, una mejor clarificación y estabilidad del producto. Del mismo modo, estas enzimas se utilizan para la extracción y clarificación de frutas y

verduras, aumentan el aroma y potencia las propiedades del producto (Singh et al., 2021).

### 2.1.2. Lacasas

Las lacasas pertenecen a la familia denominada oxidasas multicobre, las cuales son capaces de catalizar la oxidación de sustratos utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones. La unidad funcional de las lacasas fúngicas incluye cuatro cobres catalíticos coordinados covalentemente a la estructura principal de la proteína por diez residuos de histidina y un residuo de cisteína. Los cuatro iones de cobre contenidos en el sitio activo de la lacasa son clasificados según sus características espectroscópicas en tipo 1 (T1): presenta una absorción a 605-610 nm, en estado oxidado, le otorga un color azul característico a las lacasas, tipo 2 (T2): no tiene señal en los espectros de absorción visibles y tipo 3 (T3): se caracterizan por estar en un rango aproximado a 330 nm de absorción (Loi et al., 2021). La acción catalítica de la lacasa consiste en: i) reducción del cobre T1 mediante la reducción del sustrato, ii) transporte interno de electrones desde el cobre T1 al cobre T2 y T3 y iii) reducción del oxígeno en agua en el sitio del cobre T2 y T3.

La lacasa fue aislada por primera vez del árbol asiático *Toxicodendron vernicifluum* o árbol de laca en el año de 1883, una década después se describió la primer lacasa fúngica (Singh y Gupta, 2020). En los organismos fúngicos, la lacasa está involucrada en diversas funciones fisiológicas como en la respuesta ante el estrés, esporulación, desarrollo morfogénico, interacciones planta-patógeno/huésped, formación de pigmentos y su rol más estudiado que es la degradación de la lignina (Mate y Alcalde, 2016). Las lacasas fúngicas poseen tres propiedades potenciales que las convierten en biocatalizadores versátiles para la industria: a) actividad catalítica no específica sobre una gama de compuestos aromáticos y polímeros de lignina, b) son ecológicas (solo requieren oxígeno y producen agua) y c) en la mayoría de los casos, poseen un alto potencial redox, por estas grandes ventajas las lacasas se utilizan con

finés ambientales y en diversos sectores industriales (Aza y Camarero, 2023). A continuación se exponen algunos ejemplos al respecto:

-Biorremediación: las lacasas han sido evaluadas con éxito como importantes herramientas para la biodegradación y transformación de contaminantes. Se ha demostrado su habilidad para detoxificar efluentes derivados de industrias papeleras, agrícolas y de textiles, también, se ha estudiado su uso para la eliminación de la contaminación por hidrocarburos. En cuanto a residuos farmacéuticos, se han estudiado estas enzimas para eliminar contaminantes por antibióticos, naproxeno y carbamazepina en aguas residuales (Patel et al., 2020)

-Industria alimenticia: las lacasas han sido utilizadas en la producción de bebidas para eliminar compuestos fenólicos y estabilizar las propiedades organolépticas de los productos finales, por ejemplo, para remover compuestos aromáticos, prevenir la pérdida de sabor y prolongar la vida media de la cerveza y el vino. En la elaboración del pan, estos biocatalizadores modifican la textura y la consistencia de la masa, incrementando la resistencia y estabilidad del producto (Aza y Camarero, 2023).

-Biosensores: gracias a su capacidad para catalizar la transferencia directa de electrones, estas enzimas se han estudiado con el desarrollo de biosensores. Las lacasas reducen el  $O_2$  a  $H_2O$  y posteriormente el biosensor registra el consumo de oxígeno durante la oxidación del analito, estos biosensores se han desarrollado para diversos ámbitos, como en la industria alimentaria para detectar polifenoles en jugos de frutas, vino y té y cuantificar la contaminación fúngica en mostos de uva. Los biosensores basados en lacasa también se han desarrollado en biomedicina para detectar insulina, morfina y codeína (Rodríguez et al., 2015).

### **2.1.3. Lignina peroxidasa**

La lignina peroxidasa (LiP) es una enzima perteneciente a la familia de las oxidorreductasas. Esta enzima cataliza la degradación oxidativa dependiente del hidrógeno de la lignina, y es ampliamente reconocida por su capacidad para despolimerizar este compuesto, el cual es el segundo componente estructural más

importante de la pared celular vegetal. La LiP fue descubierta en el micromiceto *Phanerochaete chrysosporium*, a lo largo de los años, se ha identificado que es secretada por diversas especies de hongos y bacterias. Esta enzima participa activamente en la degradación de una amplia gama de compuestos aromáticos, compuestos fenólicos y compuestos de lignina no fenólicos (Zainith et al., 2020).

La LiP ha adquirido cada vez más atención dentro de las ciencias biológicas y la industria debido a sus diversas aplicaciones biotecnológicas, como su uso dentro de la producción de cosméticos, textiles, biodegradación de contaminantes, procesamiento de pulpa, entre otros más como son:

- Industria cosmética: al comprobarse su capacidad melanocítica al decolorar melanina sintética, la LiP tiene un gran potencial de utilidad en las industrias de fabricación de cosméticos, principalmente en la elaboración de productos para aclarar la piel (Falade et al., 2016).

- Tratamiento de efluentes textiles y decoloración de tintes: se ha demostrado que el uso de isoenzimas de lignina peroxidasa para el tratamiento de aguas residuales para la remoción de tintes como el azul de metileno e índigo (Parshetti et al., 2012).

Dentro de otros usos industriales de este biocatalizador se encuentra su aplicación en la industria de la pulpa y del papel permitiendo la sustitución de métodos convencionales de deslignificación sin afectar la integridad de las fibras de celulosa, de la misma manera esta enzima es fuente de aromáticos naturales, además se utiliza para la producción de vainillina y cerveza (Zainith et al., 2020; Chowdhary et al., 2020).

#### **2.1.4. Manganese peroxidase**

La manganese peroxidase (MnP) es una hemoproteína que pertenece a la familia de las oxidorreductasas y se encarga de catalizar la despolimerización oxidativa de la lignina. En la naturaleza, la MnP es producida principalmente por hongos causantes de podredumbre blanca como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes* sp.,

*Ganoderma lucidum* entre otros. Asimismo, se ha reportado la producción de MnP en diversas bacterias, como *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *Lactobacillus kefir*, entre otras (Xu et al., 2017).

Gracias a su capacidad para oxidar diferentes compuestos aromáticos y fenólicos, la manganoso peroxidasa (MnP) posee una amplia variedad de aplicaciones industriales y biotecnológicas, entre las que destacan:

- Biorremediación: se ha comprobado que la MnP actúa como biocatalizador en la degradación de tintes de origen textil presentes en aguas residuales. Principalmente, se ha estudiado la MnP producida por hongos del género *Trametes* (Lueangjaroenkit et al., 2019).

- Industria alimentaria: el uso de MnP en el proceso de clarificación de jugos de fruta es de gran relevancia debido a su capacidad para descomponer compuestos fenólicos hasta en un 89%, además de reducir la turbidez en este tipo de bebidas (Bilal et al., 2017).

- Biocombustibles: se ha explorado su aplicación en la producción de bioetanol, mediante el pretratamiento de residuos agrícolas con enzimas ligninolíticas como la MnP (Asgher et al., 2014).

## **2.2. Hongos promotores de crecimiento vegetal**

El uso de microorganismos benéficos en la agricultura se ha transformado en un área de investigación de gran interés e importancia, por presentar un rol fundamental en la seguridad alimentaria y en la producción agrícola sostenible, incluso se ha planteado que el uso de biofertilizantes microbianos responde a la necesidad global de implementar tecnologías agrícolas sostenibles y respetuosas con el medio ambiente, al mismo tiempo que contribuye a reducir los elevados costos económicos y ambientales asociados a los fertilizantes sintéticos (Palacios, 2023).

Estos organismos microscópicos como lo son los hongos, bacterias y virus son altamente diversos y constituyen la estructura biológica más relevante del ecosistema

del suelo. Gracias a su singularidad y dinamismo, los hongos promotores de crecimiento vegetal (PGPF por sus siglas en inglés), se han convertido en candidatos claves en la agricultura moderna y orgánica. (Kenneth et al., 2020).

Con respecto a los hongos, los PGPF constituyen un grupo heterogéneo de especies no patógenas asociadas a las plantas, que mediante diversos mecanismos contribuyen a mejorar su salud y crecimiento. Es importante destacar que este grupo está conformado principalmente por hongos saprobios no simbióticos, los cuales habitan libremente en la superficie de la raíz, en su interior o en la rizosfera (Murali, et al., 2021). Estos hongos pueden diferir entre sí en cuanto a hábitat, fisiología, taxonomía y formas de interacción con la planta. Además, un hongo que promueve el crecimiento de una especie vegetal puede no ejercer el mismo efecto en otra, o dicho efecto puede variar en función de diferentes condiciones ambientales.

Según la literatura, la mayoría de los hongos clasificados como PGPF pertenecen al filo *Ascomycota* (géneros como *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Purpureocillium*, entre otros), aunque también se han identificado representantes de los filos *Basidiomycota* (*Limonomyces*, *Rhizoctonia*, etc.) y *Zygomycota* (*Mucor*, *Rhizopus*). Cabe señalar que algunos géneros como *Fusarium*, *Colletotrichum* y *Rhizoctonia* pueden actuar como fitopatógenos en determinadas especies vegetales, aunque en otras pueden carecer de virulencia funcional (Hossain et al., 2017; Bent, 2006; Muslim et al., 2003).

Son múltiples los beneficios que se pueden presentar en la interacción PGPF-planta en los organismos vegetales, dentro de los que resaltan: a) mejora en la tasa de germinación y vigor en las semillas, b) impacto positivo en el crecimiento de raíces: aumento de biomasa radicular, formación de raíces laterales y promoción de pelos radiculares, c) aumento de área foliar y contenido de clorofila, d) influencia en el número, tamaño y momento de floración, e) aumento en el contenido de compuestos

bioactivos y f) protección y resistencia ante estrés biótico (patógenos) y abiótico (hídrico, salino, etc.), entre otros.

La interacción entre hongos promotores del crecimiento vegetal y las plantas constituye un proceso complejo, mediado por una diversidad de mecanismos tanto directos como indirectos que favorecen el desarrollo vegetal. Entre estos mecanismos se incluyen la síntesis de fitohormonas, la producción de compuestos volátiles, el incremento en la absorción de nutrientes, producción de sideróforos, la supresión o el antagonismo frente a fitopatógenos, así como la solubilización de minerales. Este último mecanismo, en particular, ha captado un notable interés en el ámbito científico por su potencial aplicación en la agricultura, destacándose la solubilización de fósforo como una de las estrategias más prometedoras para mejorar la disponibilidad de este nutriente esencial en los suelos agrícolas (Hossain et al., 2014).

### **2.3. Hongos solubilizadores de fósforo**

El fósforo (P) es uno de los elementos más importantes y determinantes para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas. Desempeña un papel clave en procesos celulares, como la síntesis de biomoléculas, la formación y mantenimiento de estructuras de membranas, además es un componente esencial de los ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP y ADP (fuentes de energía química). El fósforo también estimula la germinación de semillas y el vigor de las plántulas, promueve el desarrollo de raíces y tallos y mejora tanto el rendimiento como la calidad de los cultivos e incluso, se ha reportado que puede conferir mayor resistencia a ciertas enfermedades (Mixquititla y Villegas, 2016).

#### **2.3.1. Ciclo del fósforo**

Es un proceso biogeoquímico que regula el flujo de este nutriente esencial entre el suelo, los organismos vivos y la materia orgánica. A diferencia de otros elementos, el fósforo no tiene una fase gaseosa, por lo que su disponibilidad depende de procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren en el suelo. Una gran parte del fósforo se



encuentra en formas insolubles, lo que limita su aprovechamiento por las plantas. En este contexto, los hongos del suelo desempeñan un papel fundamental al liberar ácidos orgánicos y enzimas que movilizan el fósforo retenido en minerales y compuestos orgánicos. En los suelos, el fósforo existe principalmente en dos formas: inorgánica y orgánica.

El fósforo inorgánico se origina de la meteorización de la roca madre y se encuentra en minerales primarios como la apatita, hidroxiapatita y oxiapatita, compuestos que, debido a su escasa solubilidad, limitan su disponibilidad inmediata para las plantas. Bajo condiciones ambientales favorables, estos minerales pueden liberarse lentamente y aportar fósforo al sistema biológico. A su vez, parte del fósforo inorgánico se adsorbe a la superficie de óxidos hidratados de hierro, aluminio y manganeso, formando asociaciones aún más difíciles de movilizar. Solo el 0,1% del P total existe en una forma soluble disponible para la absorción de la planta debido a su fijación en una forma no disponible (Zhou et al. 1992 ).

Paralelamente, la materia orgánica del suelo representa una reserva significativa de fósforo, que puede abarcar entre un 5% y un 95% del total, dependiendo del tipo de suelo y las condiciones ecológicas. Entre las formas orgánicas, el fosfato de inositol o fitato destaca por su estabilidad y abundancia, seguido de otros compuestos como fosfomonoésteres, fosfodiésteres, fosfotriésteres, fosfolípidos y ácidos nucleicos. Sin embargo, solo una pequeña fracción del fósforo orgánico se encuentra en estructuras directamente accesibles para los microorganismos o las plantas, lo que resalta la importancia de los procesos de solubilización impulsados por la microbiota del suelo (Reyes et al., 2023).

Diversos estudios han evidenciado que varios micromicetos tienen la capacidad de solubilizar fosfatos, destacándose géneros como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* y *Paecilomyces*. Se estima que los hongos solubilizadores de fósforo (HSF) representan entre el 0,1 % y el 0,5 % de las poblaciones fúngicas totales en el suelo (Kucey, 1983).

Entre sus principales ventajas, los HSF destacan por su estabilidad funcional, ya que mantienen su capacidad de solubilización de fósforo incluso tras múltiples subcultivos en condiciones de laboratorio, a diferencia de las bacterias solubilizadoras de fósforo. Además, su habilidad para desplazarse a mayores distancias en el suelo les confiere una ventaja adicional en la movilización eficiente de este nutriente, ampliando así su impacto en el entorno rizosférico (Sharma, et al., 2013).

### **2.3.2. Mecanismos de solubilización de fósforo por HSF**

La solubilización hace referencia al proceso mediante el cual el fósforo inorgánico, inicialmente no disponible, se transforma en formas asimilables para las plantas (Sharma et al., 2013). En los micromicetos, la producción de ácidos orgánicos representa el principal mecanismo de solubilización, donde el grupo aniónico de estos ácidos reacciona con iones metálicos, formando complejos más estables que los que originalmente sostenían al fósforo, liberándolo así al medio.

Ácidos como el oxálico, malónico, succínico y glucónico han sido identificados en estos procesos. Esta estrategia resulta particularmente eficaz en suelos con pH ácido, bajo contenido de calcio y alto contenido de materia orgánica, además de depender de la concentración de fósforo disponible en el sistema (Reyes, et al., 2023; Begonia et al., 2004). Además de la producción de ácidos orgánicos, algunos hongos solubilizadores de fósforo emplean enzimas fosfatasa y fitasa para liberar fósforo de compuestos orgánicos presentes en el suelo. Las fosfatasas hidrolizan enlaces fosfato de moléculas simples, mientras que las fitasas actúan específicamente sobre el fitato, una forma de fósforo orgánico abundante pero poco disponible. La actividad enzimática es crucial en suelos ricos en materia orgánica, donde la liberación de fósforo inorgánico favorece su absorción por las plantas. La producción de estas enzimas puede variar según el pH del suelo, la especie del hongo y la disponibilidad del P (Sharma et al., 2013).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La necesidad de desarrollar tecnologías sostenibles y respetuosas con el medio ambiente ha impulsado el interés científico por el aprovechamiento de microorganismos con potencial biotecnológico. En este escenario, los hongos microscópicos debido a su notable versatilidad metabólica, su capacidad de adaptación a múltiples nichos ecológicos y su producción de enzimas extracelulares, representan una fuente de biomoléculas poco conocida con aplicaciones en diversos sectores industriales y agrícolas (Wrzosek et al., 2016).

A pesar del avance en la bioprospección de microorganismos, muchas cepas nativas permanecen inexploradas, lo que limita su aprovechamiento en procesos industriales que demandan biocatalizadores eficientes, estables y ambientalmente seguros. Además de su capacidad enzimática, diversos hongos poseen propiedades que favorecen el crecimiento vegetal, ya sea mediante la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas o la mejora en la absorción de nutrientes (Vassileva et al., 2022). Esta multifuncionalidad resulta especialmente relevante para el desarrollo de bioinsumos agrícolas capaces de reducir la dependencia de fertilizantes y pesticidas químicos, y así contribuir a una agricultura más sustentable (Palacios, 2023).

En este contexto, la presente investigación se justifica por la necesidad de detectar e identificar hongos microscópicos nativos con potencial enzimático, capacidad fosfato solubilizadora y promoción del crecimiento vegetal para su aplicación en biotecnología. Esta aproximación holística responde a los desafíos actuales de sostenibilidad, y permite avanzar hacia modelos de producción más eficientes y respetuosos con el entorno.

#### **4. HIPÓTESIS**

Tomando en cuenta las capacidades fisiológicas que los hongos han desarrollado a lo largo de su evolución, es de esperar que las cepas en estudio presenten actividad enzimática, capacidad solubilizadora de fósforo y efecto promotor del crecimiento vegetal en distintos niveles de expresión, dependiendo de su forma de vida saprobia o endófito.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

Conocer y comparar las capacidades fisiológicas de micromicetos mediante su producción enzimática, solubilización de fosforo y promoción del crecimiento vegetal in vitro con el fin de identificar cepas con potencial para su aprovechamiento biotecnológico.

##### **5.2. Objetivos específicos**

1. Evaluar mediante pruebas cualitativas, la capacidad de producción de celulasas, lacasas, lignina y manganeso peroxidasas por parte de cepas de micromicetos.
2. Evaluar mediante pruebas cuantitativas la producción de lacasa por parte de las cepas de micromicetos con mejor respuesta en la prueba cualitativa.
3. Evaluar de manera cualitativa y cuantitativa la capacidad de solubilización de fosfato de micromicetos seleccionados.
4. Evaluar el efecto de la inoculación de las cepas seleccionadas en el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* DR5 cultivadas in vitro.

## 6. METODOLOGÍA

El presente estudio se estructuró en tres bloques, en los cuales se evaluaron distintas capacidades fisiológicas de cepas de micromicetos (Fig. 1): 1) la evaluación cualitativa de las enzimas celulasa, lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa mediante medios reveladores, así como la evaluación cuantitativa de la actividad lacasa; 2) la evaluación cualitativa y cuantitativa de la solubilización de fósforo (SF); y 3) la evaluación del efecto inhibidor y/o promotor del crecimiento vegetal en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, considerando diversos parámetros.

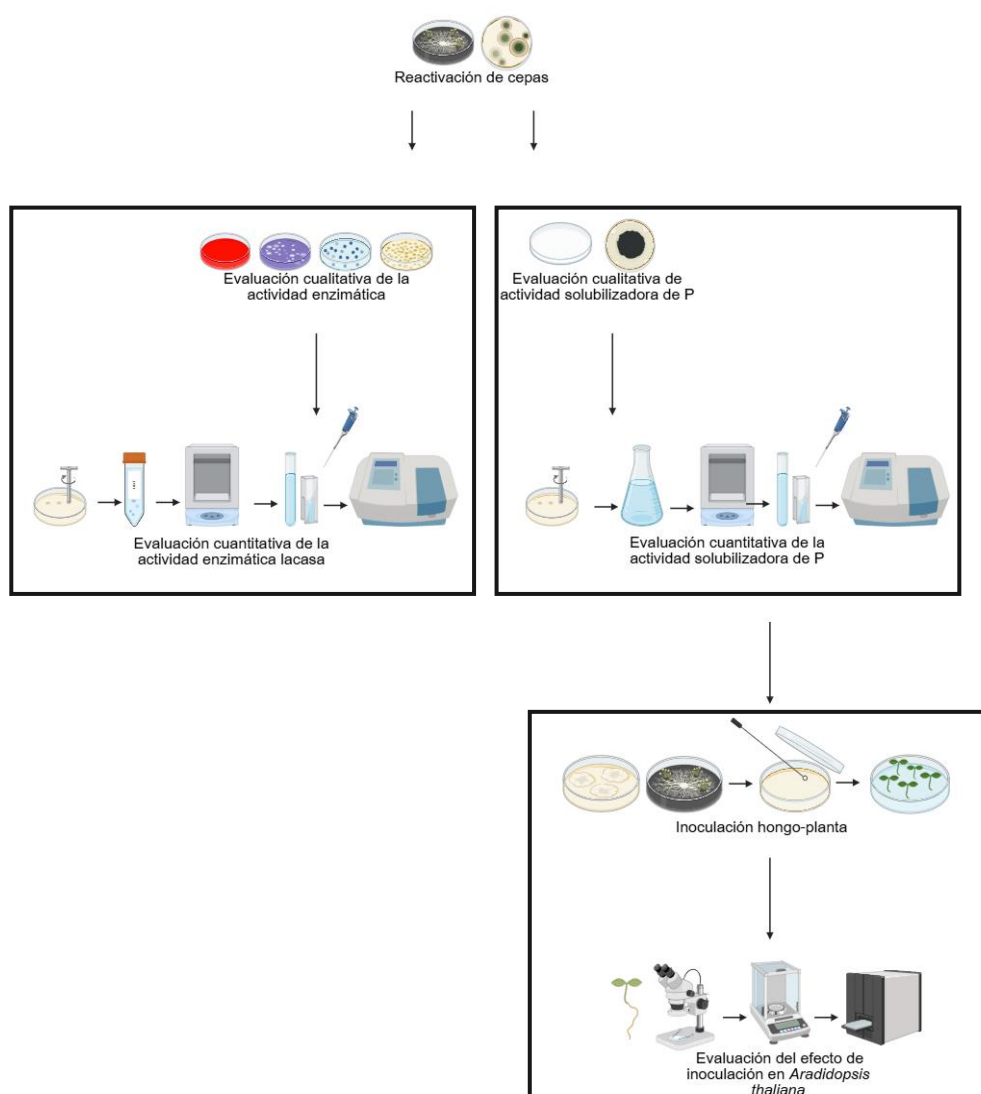


Figura 1. Metodología. Bloques de experimentación.

### 6.1. Reactivación de cepas de micromicetos

Las cepas utilizadas en el presente estudio (Tabla 1) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Diversidad de Micromicetos (LDM) del Instituto de Ecología A.C. Estas cepas, previamente aisladas de diversas localidades, principalmente del estado de Veracruz, fueron reactivadas en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), incubándolas durante 5-7 días a temperatura ambiente. La ubicación taxonómica de las especies se obtuvo a partir de análisis moleculares de las regiones ITS y LSU realizados por personal del LDM.

Los reactivos y formas de preparación de los diferentes medios empleados en este trabajo se detallan en los anexos que se mencionan a continuación.

Tabla 1. Cepas utilizadas para las diferentes pruebas.

Clave	Sustrato	Forma de vida	Lugar de origen
1ER	Hoja de <i>Quercus</i> sp.	Saprobio	Hidalgo
41RC	Restos vegetales	Saprobio	Veracruz
E220	Hoja de cícada	Endófito	Veracruz
S202	Suelo	Saprobio	Veracruz
S77	Suelo	Saprobio	Veracruz
S78	Suelo	Saprobio	Veracruz
S79	Suelo	Saprobio	Veracruz
7ER	Hoja de <i>Quercus</i> sp.	Saprobio	Hidalgo
S180	Suelo	Saprobio	Veracruz
E219	Hojas de cícada	Endófito	Veracruz
19RC	Restos vegetales	Saprobio	Veracruz
E216	Hoja de cícada	Endófito	Veracruz
S185	Suelo	Saprobio	Veracruz
H105	Restos vegetales	Saprobio	Veracruz
H113	Restos vegetales	Saprobio	Veracruz
21RC	Restos vegetales	Saprobio	Veracruz
E215	Hojas de cícada	Endófito	Veracruz
36RC	Restos vegetales	Saprobio	Veracruz
E217	Hojas de cícada	Endófito	Veracruz
E68	Hojas vivas	Endófito	Veracruz
E64	Hojas de planta de dunas	Endófito	Veracruz
E201/OT5	Pecíolo de hoja de olmo	Endófito	Veracruz
E200/EP3	Pecíolo de hoja de fresno	Endófito	Veracruz

E214	Hojas de cícada	Endófito	Veracruz
E65	Hojas de planta de dunas	Endófito	Veracruz
S105	Suelo	Saprobio	Veracruz
S181	Suelo	Saprobio	Veracruz
S98	Suelo	Saprobio	Veracruz
10ER	Hoja de <i>Quercus</i> sp.	Saprobio	Hidalgo
E156	Tallo de liquidambar	Endófito	Veracruz
E213/LMF3	Hoja de liquidambar	Endófito	Veracruz
EPG1	Peciolo	Endófito	Chiapas
H7/D11	Restos vegetales	Saprobio	Veracruz
H79	Restos vegetales	Saprobio	Veracruz
H80	Hojas <i>Q. germana</i>	Endófito	Veracruz
S206	Suelo	Saprobio	Veracruz
SPC1	Peciolo de cocoloba	Saprobio	Chiapas
SPT1	Peciolo	Saprobio	Yucatán
E218	Hoja de cícada	Endófito	Veracruz
9ER	Resto vegetal de bambú	Saprobio	Hidalgo
E67	Hojas de planta de dunas	Endófito	Veracruz
E63	Hojas de planta de dunas	Endófito	Veracruz
42RC	Restos vegetales	Saprobio	Veracruz
8ER	Hoja de aguacate	Saprobio	Hidalgo
18ER	Resto vegetal	Saprobio	Hidalgo

## 6.2. Actividad enzimática

### 6.2.1. Detección cualitativa de la actividad enzimática

Para esta fase, se emplearon distintos medios de cultivo sólidos, de acuerdo con la actividad enzimática que se deseaba evaluar. Después de ser elaborados y esterilizados, los medios de cultivo se dejaron reposar durante 24 horas.

La detección de actividad celulolítica se realizó de acuerdo con el protocolo de Sazci y colaboradores (1986), utilizando un medio con carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato (Anexo 1). Las cepas fueron inoculadas en este medio e incubadas a temperatura ambiente. Una vez que las colonias alcanzaron un diámetro aproximado de 3 cm, se aplicó una solución de Rojo Congo al 1 %, cubriendo completamente las colonias, y se dejaron en reposo durante 15 minutos. Posteriormente, la solución fue retirada y se añadió una solución de NaCl 1 M, la cual se dejó actuar durante 15

minutos antes de ser eliminada (Fig. 2A). La hidrólisis de la CMC por celulasas se evidenció mediante la formación de halos incolores alrededor de las colonias, lo que confirmó la presencia de esta actividad enzimática.

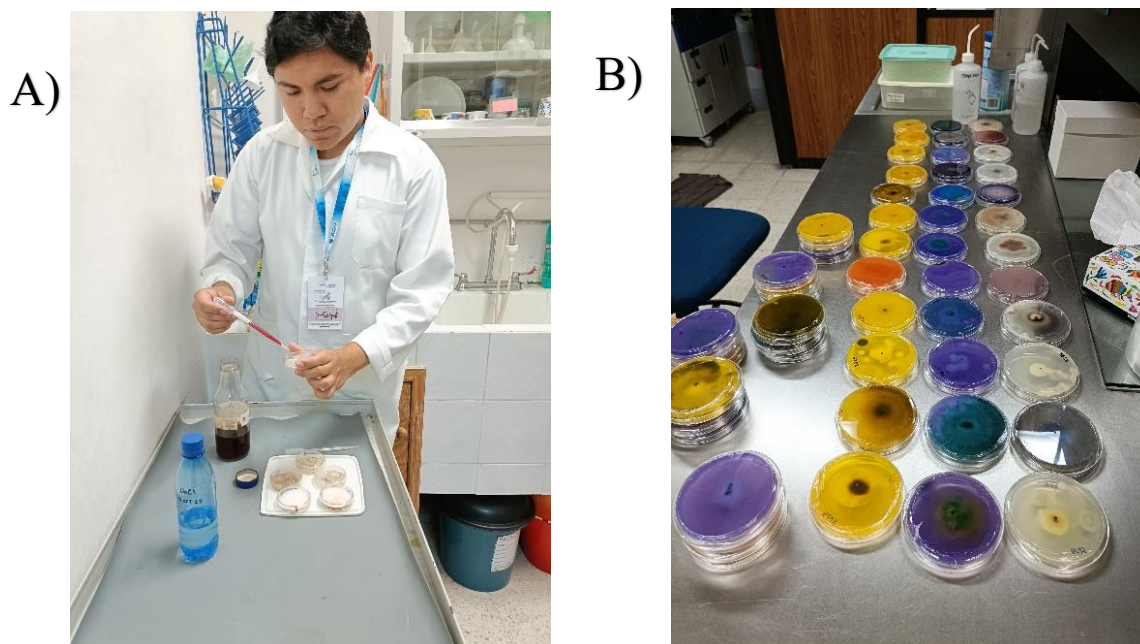


Figura 2. A) Realización de detección de celulasas con Rojo Congo. B) Visualización de pruebas cualitativas para actividad enzimática lacasa (cajas azules), lignina peroxidasa (cajas violetas) y manganoso peroxidasa (cajas amarillas).

Por su parte, para la detección cualitativa de la actividad de las enzimas lacasa, lignina peroxidasa (LiP) y manganoso peroxidasa (MnP), se preparó un medio sólido base (Rubilar, 2007), al que se incorporaron distintos compuestos reveladores, dependiendo de la enzima a evaluar (Anexo 2). Para la detección de lacasa se utilizó ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), que al ser oxidado por las enzimas extracelulares del hongo cambia de incoloro a verde esmeralda. En el caso de la lignina peroxidasa, se empleó como revelador el colorante Azure B, el cual cambia de azul violeta a incoloro en presencia de la enzima. Finalmente, para la detección de manganoso peroxidasa se utilizó Rojo fenol, que presenta una decoloración de amarillo a naranja ante la enzimática en cuestión (Fig. 2B). Cada una de las pruebas enzimáticas en medio sólido se realizó por triplicado. Después de una semana de inoculación en los medios reveladores y en el caso de celulasas, una vez



que las colonias alcanzaron un diámetro aproximado a 3 cm y se le realizara la prueba correspondiente, se procedió a la clasificación de las respuestas cualitativas para las diferentes actividades enzimáticas evaluadas. Para ello, se realizaron las mediciones de los halos de respuesta formados, a los cuales se les restó la medida del halo de la colonia. Dichos valores se catalogaron empleando una escala establecida para este trabajo: - = halo no presente, + = menor a 1 cm, ++ = de 1 a 2 cm, +++ = mayor a 3 cm.

### 6.2.2. Evaluación cuantitativa de la actividad lacasa

El ensayo se realizó con las cepas seleccionadas a partir de sus resultados en la determinación cualitativa de la actividad lacasa, siguiendo el protocolo descrito por Arámbula (2017). Cada cepa fue inoculada con diez discos de micelio (5 mm de diámetro) en tubos Falcon de 50 mL que contenían 10 mL de buffer de acetato de sodio (Fig. 3A) (ver Anexo 3). Los tubos se colocaron aleatoriamente en una incubadora con agitación orbital a temperatura ambiente, a 70 rpm, durante 24 horas (Fig. 3B). Posteriormente, las muestras se filtraron con papel Whatman No. 42 para eliminar la biomasa fúngica (Fig. 3C). Del filtrado, se tomaron 200 µL del extracto fúngico, a los cuales se añadieron 100 µL de ABTS (0.5 mM) y 700 µL de buffer de acetato de sodio. Tras agitar la mezcla, se realizó la lectura de absorbancia a 420 nm durante tres minutos en un espectrofotómetro modelo Genesys 10S UV-Vis (Fig. 2D). Con los datos obtenidos, se calculó la actividad enzimática de lacasa expresada en unidad de actividad enzimática lacasa (U/L) mediante la ecuación propuesta por Páez (2012).

$$\text{Lacasa} \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{\Delta Abs * Vt}{t * \xi * \lambda * Vm} * 100000$$

En donde:

$\Delta Abs$ = Absorbancia final – Absorbancia inicial

$Vt$ = Volumen total

$t$ = Tiempo de reacción de 3 minutos

$\xi$ = Valor de coeficiente de extinción de extinción de 29,300 mol/cm

$\lambda$ = Haz de luz

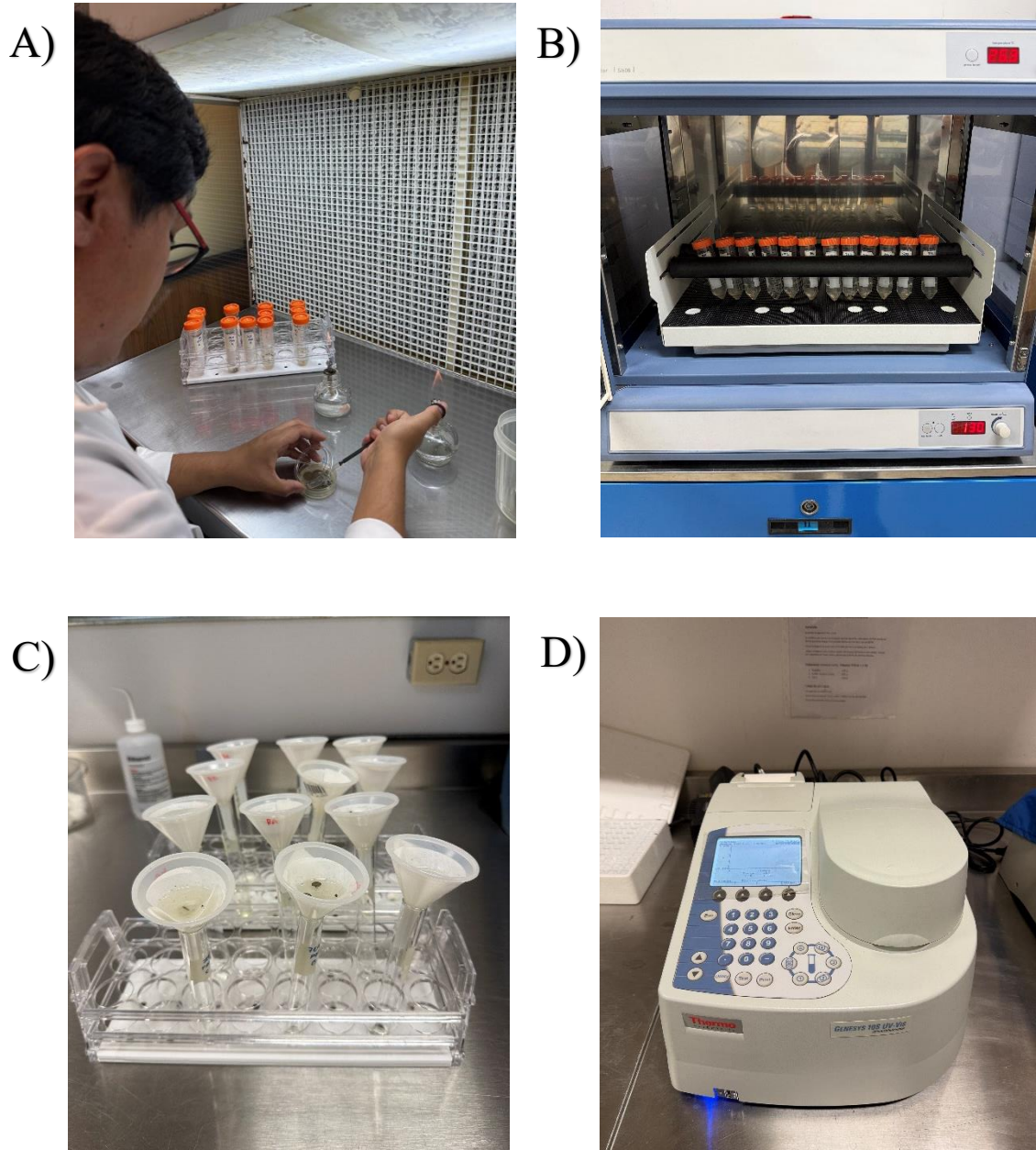


Figura 3.A) Inoculación de cepas en tubos Falcón. B) Tubos colocados en incubadora con agitación orbital. C) Proceso de filtrado del extracto fúngico. D) Espectrofotómetro durante medición de absorción.

### **6.3. Actividad solubilizadora de fósforo**

#### **6.3.1. Detección cualitativa de solubilización de fósforo**

Para esta actividad se aplicó el método descrito por Sundara y Sinha (1963) en el que se utiliza medio sólido revelador de fosfatos (Anexo 4). Este fue vaciado en cajas de Petri, dejado solidificar y reposar durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a la inoculación de las cepas mediante la colocación de un punto en el centro de cada caja de Petri. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 3-7 días en dependencia de la dinámica de crecimiento de las cepas. Una vez que las colonias alcanzaron un diámetro aproximado de 3 a 3.5 cm se clasificaron las respuestas cualitativas de solubilización de fósforo. La capacidad de solubilización de fósforo (SF) se determinó por la presencia de un halo hialino alrededor de la colonia. De igual forma que con la evaluación cualitativa de actividad enzimática, se midieron de los halos de respuesta formados, a los cuales se les restó la medida del halo de la colonia. Para este estudio se catalogaron las respuestas de la siguiente forma: - = halo no presente, + = menor a 1 cm, ++ = de 1 a 2 cm, +++ = mayor a 3 cm.

#### **6.3.2. Evaluación cuantitativa de la solubilización de fósforo**

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo solamente en las cepas que presentaron una mayor respuesta en el ensayo cualitativo. Los cultivos seleccionados se inocularon (cinco discos de micelio de 5 mm de diámetro) en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 75 mL de medio líquido de Sundara (sin agar). Para cada cepa se prepararon cinco repeticiones, como testigos se incluyeron cinco matraces únicamente con medio. Los matraces se colocaron aleatoriamente en una incubadora con agitación orbital a temperatura ambiente y en movimiento a 70 rpm.

Los muestreos se realizaron a 5, 12, 15, 20 y 25 días posteriores a la inoculación. En cada fecha, y bajo condiciones asépticas, en tubos de ensaye se vaciaron 15 mL de cada cultivo. Las muestras fueron filtradas con papel Whatman No. 42 para eliminar la biomasa fúngica (Fig. 4A, 4B). Posteriormente, se midió el pH del filtrado con un potenciómetro. Las muestras fueron diluidas en proporción 1:50 con agua destilada estéril, a cada una se le añadieron 2 mL de reactivo combinado (Anexo 5). Las mezclas

se dejaron en reposo durante 20 minutos, posteriormente, se tomaron 10 mL y en un espectrofotómetro modelo Genesys 10S UV-Vis se midió la absorbancia a 880 nm. La concentración de fósforo soluble se determinó mediante el método colorimétrico de reducción con ácido ascórbico (Fig. 4C). Los datos obtenidos se compararon con una curva estándar de fósforo y se expresaron en mg/L con ayuda de la siguiente ecuación:

$$CTP = (FD) (C. \text{ mg/L})$$

En donde:

FD = Factor de dilución de la muestra

C. mg/L = (Absorbancia de la muestra – intercepto) / (pendiente)

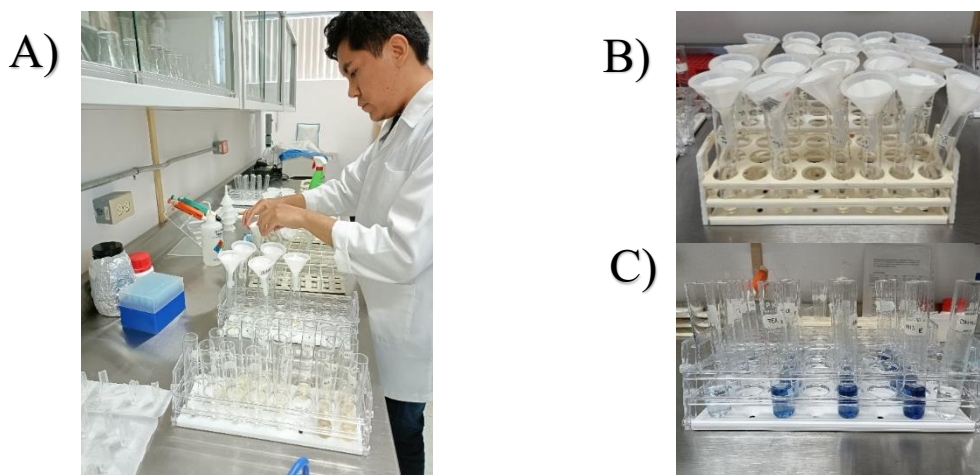


Figura 4. A) y B) Proceso de filtración de muestra C) Muestras después de haberse añadido el reactivo combinado.

#### 6.4. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento vegetal

Este ensayo se llevó a cabo con las cepas seleccionadas de acuerdo con los resultados en la evaluación de solubilización de fósforo; las cuales fueron *Cladosporium* sp. (7ER), *Gonatobotryum apiculatum* (H105) y *Parascedosporium putredinis* (H113) junto con las cepas *Arthrinium* sp. (41RC) y *Pestalotiopsis* sp. (SPC1), las cuales fueron seleccionadas al azar (Fig. 5). El método que se empleó fue el descrito por Castillo y colaboradores (2021), con modificaciones a las condiciones del presente estudio.

Los parámetros evaluados en este bioensayo fueron: a) la longitud de las raíces primarias, b) el número y densidad de raíces laterales, c) el peso fresco radicular y foliar, d) concentración de clorofila y e) visualización de auxinas.

#### **6.4.1. Desinfección y siembra de semillas**

Para esta evaluación se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* de la línea DR5, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Ecología A.C. Las semillas fueron desinfectadas siguiendo el siguiente protocolo: (a) lavado con etanol al 96 % durante 7 minutos; (b) lavado con hipoclorito de sodio al 20 % durante 7 minutos; y (c) seis enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas fueron colocadas en tubos Eppendorf con 500 µL de agua destilada estéril y mantenidas en reposo a 4 °C durante 24 horas. Transcurrido este periodo, el material vegetal fue sembrado utilizando una micropipeta de 10 µL en cajas de Petri con medio Murashige y Skoog (MS) previamente preparado (Anexo 6). En cada caja se dispusieron tres hileras con 13 semillas cada una. Finalmente, las cajas fueron selladas y colocadas en una cámara de crecimiento para plantas, en posición inclinada.

#### **6.4.2. Inoculación hongo-planta**

Tras siete días de incubación, las plántulas fueron transferidas a cajas de Petri con medio MS, utilizando pinzas estériles. En cada caja se dispuso una fila con 10 plántulas, distribuidas de manera uniforme. Posteriormente, bajo condiciones asépticas y con ayuda de un bisturí estéril, se cortó un fragmento de micelio de 0.5 × 0.5 cm de las cepas seleccionadas. Estos fragmentos se colocaron en el extremo opuesto de cada caja (Fig. 6). Finalmente, las cajas se sellaron cuidadosamente y se colocaron nuevamente en la cámara de crecimiento.



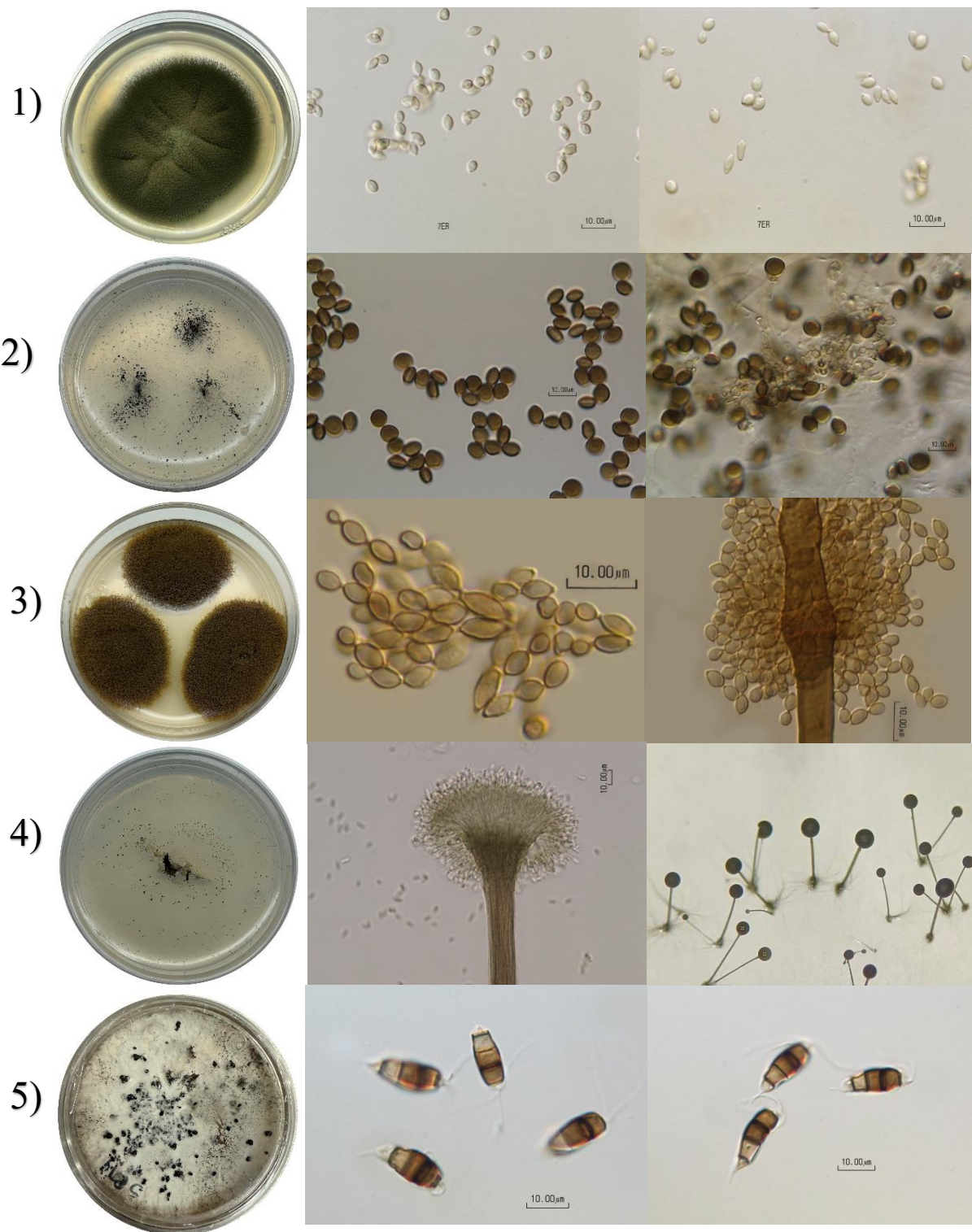


Figura 5. Colonias en medio de cultivo y microscopía de las cepas seleccionadas. 1) *Cladosporium* sp (7ER.), 2) *Arthrinium* sp. (41RC.), 3) *Gonatobotryum apiculatum* (H105), 4) *Parascledosporium putredinis* (H113) y 5) *Pestalotiopsis* sp. (SPC1)

Se establecieron 6 tratamientos experimentales: 3 con cepas previamente seleccionadas por su capacidad solubilizadora de fósforo, 2 con cepas elegidas al azar, y un tratamiento testigo sin hongo. De cada tratamiento se realizaron 3 réplicas.



Figura 6. Inoculación hongo-planta en Medio MS cepa H105-planta y cepa SPC1-planta

#### **6.4.3. Medición de raíces primarias, conteo de raíces laterales y obtención de peso fresco**

Transcurridos 5 días de incubación, utilizando un microscopio estereoscópico Leica equipado con cámara se tomaron fotografías del follaje, las raíces laterales y la raíz primaria de las plántulas (Fig. 7A, B, C). Posteriormente, se llevó a cabo el conteo de raíces laterales y la medición de la raíz primaria. Finalmente, las plántulas fueron seccionadas en follaje y sistema radicular con ayuda de un bisturí y ambas partes fueron pesadas por separado.

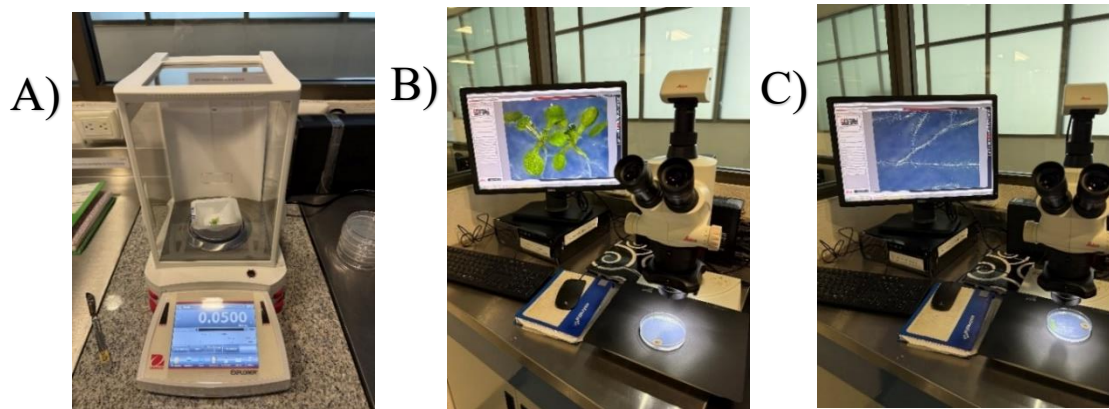


Figura 7. A) Obtención del peso fresco de la biomasa. B) Toma de imágenes del follaje. C) Toma de fotografías de las raíces laterales.

#### 6.4.4. Concentración de clorofila

El follaje fue colocado en una placa de 24 pocillos, debidamente etiquetada (Fig. 8A). A cada pozo con el material vegetal le fue agregado 1 ml de acetona al 80%, la placa fue cerrada con aluminio y puesta en oscuridad durante 3 horas. Después de este tiempo, utilizando una micropipeta, 10 µL de cada pozo anterior fue colocado por triplicado en una placa de 96 pozos, así como 3 pozos con acetona al 80% (Fig. 8B). Esta placa fue ingresada a un lector de microplacas BioTek (Fig. 8C) para la obtención de dos absorbancias: A663 y A647. Con estas mediciones, se calcularon los mg de clorofila por gramos de peso fresco con la siguiente ecuación (Lichtenthaler, 1987):

$$\text{mg Chl per g FW} = [7.15 \times A663] + [18.71 \times A647] / [1000 \times \text{FW}]$$

Donde:

FW= peso fresco

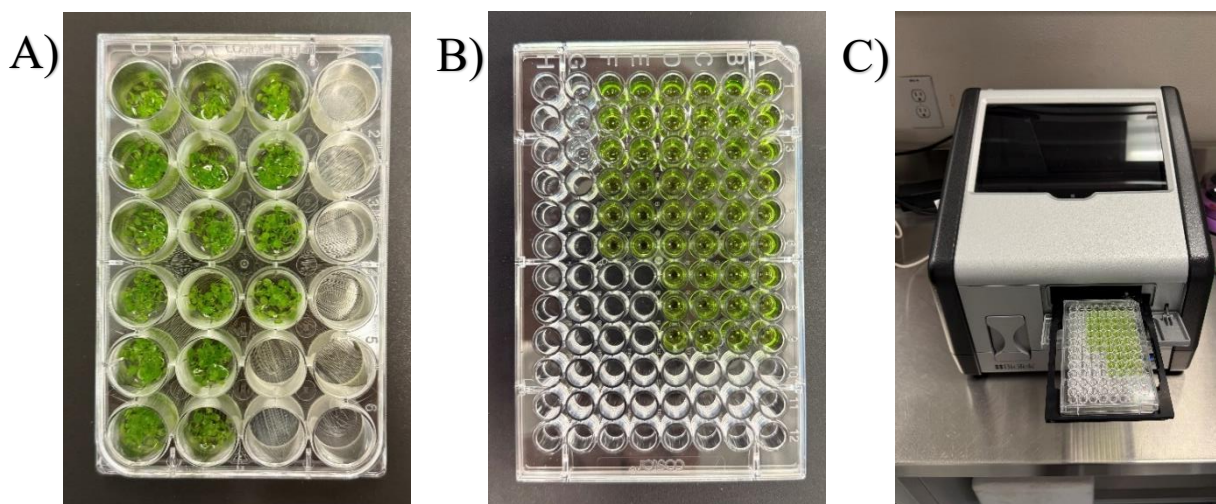


Figura 8. Obtención de la concentración de clorofila. A) Material vegetal sumergido en acetona al 80%. B) Extractos. C) Lecturas de muestras en microplacas.

#### 6.4.5. Visualización de la expresión de auxinas en *A. thaliana* línea DR5: GUS

Para la visualización de la producción de auxinas, se siguió el siguiente protocolo (Tinoco et al., 2024): en una placa de 24 pozos se colocaron las plántulas junto con 200 µL de X-Gluc en cada pozo y se incubaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la solución fue retirada y el material vegetal se incubó a 62 °C con 1 mL de la Solución 1 (Anexo 7) durante 40 minutos. Posteriormente, se eliminó dicha solución y se añadió 1 mL de la Solución 2, dejándose en reposo a temperatura



ambiente durante 25 minutos. Tras este paso, se procedió a la rehidratación del tejido con etanol al 40 %, 20 % y 10 %, con una duración de 20 minutos cada uno. Finalizado este proceso, el material vegetal se transfirió a una solución de glicerol al 50 % y se incubó durante 45 minutos. Finalmente, las muestras fueron limpiadas con alcohol, montadas en portaobjetos y observadas bajo un microscopio estereoscópico para la toma de imágenes. En las plantas transgénicas pertenecientes a la línea DR5:GUS, el color azul en los tejidos indican la expresión de las auxinas.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Detección cualitativa de actividad enzimática

En la tabla 2 se presenta el listado de las cepas estudiadas junto con las respuestas a las diferentes actividades enzimáticas y a la solubilización de fósforo.

Todas las cepas tuvieron respuesta positiva al menos para una de las cuatro enzimas probadas: 12 presentaron actividad para una enzima, 22 para 2 enzimas, 11 para tres enzimas y en ningún caso se encontró actividad para las cuatro enzimas (Tabla 2). Debido a su modo de nutrición, los hongos requieren sintetizar enzimas extracelulares para descomponer polímeros complejos en moléculas más simples, las cuales obtienen del sustrato donde se desarrollan e incorporan mediante mecanismos dinámicos de absorción a su metabolismo. La producción de dos o más enzimas por una especie fúngica se asocia con una amplia capacidad de adaptación ecológica y evolutiva, ya que estos microorganismos han desarrollado mecanismos para colonizar prácticamente cualquier tipo de sustrato orgánico vivo o inerte y obtener nutrientes para su sobrevivencia (Hage y Rosso, 2021).

De mayor a menor se encontró que el 80% (36 cepas) del material biológico evaluado mostró producción de celulasas, el 66.6% (30 cepas) actividad lignina peroxidasa, el 44.4% (20 cepas) actividad lacasa y únicamente el 6.66% (3 cepas) presentó actividad manganeso peroxidasa.

**Celulasas.** Las celulasas son enzimas ampliamente distribuidas entre los micromicetos, particularmente entre especies saprobias presentes restos vegetales (McGuire y Treseder, 2010). Estas enzimas desempeñan un papel clave en la naturaleza al degradar la celulosa considerada como el polímero orgánico más abundante en el Reino Vegetal (Mondal et al., 2022). Aunque esta actividad enzimática estuvo presente en la mayoría de las cepas estudiadas su expresión de acuerdo con la categorización establecida fue de baja a moderada, encontrándose solo en una cepa como buena (Fig. 9A).

Tabla 2. Evaluación cualitativa de actividad enzimática (C. celulosa, L. lacasa, LP. lignina peroxidasa, MP. manganeso peroxidasa) y solubilizadora de fósforo (SF) de las cepas estudiadas. += baja, ++= moderada, +++= buena, -= nula. S= saprobio, E= endófito.

Clave/Forma de vida	Aproximación taxonómica según análisis molecular	Actividad enzimática				SF
		C	L	LP	MP	
1ER/S	<i>Alternaria</i> sp.	-	-	++	-	++
41RC/S	<i>Arthrini</i> sp.	++	-	++	-	-
E220/E	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	+++	+++	-	+	-
S202/S	<i>Chaetomium</i> sp.	+	++	+	-	+
S77/S	<i>Chaetomium</i> sp.	++	+	-	-	++
S78/S	<i>Chaetomium</i> sp.	++	-	++	-	-
S79/S	<i>Chaetomium</i> sp.	+	-	+	-	++
7ER/S	<i>Cladosporium</i> sp.	+	++	+	-	+++
S180/S	<i>Cladosporium</i> sp.	++	-	-	-	+
E219/E	<i>Diaporthe</i> sp.	+	-	+	-	-
19RC/S	<i>Distoseptispora</i> sp.	+	-	+	-	-
E216/E	<i>Dothistroma pini</i>	+	+	+	-	-
S185/S	<i>Fusarium</i> sp.	+	-	-	-	++
H105/S	<i>Gonatobotryum apiculatum</i>	+	+	+	-	+++
H113/S	<i>Parascedosporium putredinis</i>	+	+	-	-	+++
21RC/S	<i>Helicotruncatum</i> sp.	+	+	+	-	-
E215/E	<i>Myrmecridium schulzeri</i>	+	+	+++	-	+
36RC/S	<i>Myrothecium</i> sp.	+	++	+	-	-
E217/E	<i>Neofusicoccum parvum</i>	-	+	++	-	-
E68/E	<i>Neofusicoccum australe</i>	-	+	+++	-	-
E64/E	<i>Neofusicoccum luteum</i>	-	+	++	-	-
E201/E	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	+	-	+++	++	-
EP3/E	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	-	-	+	++	+
E214/E	<i>Nigrospora</i> sp.	++	+	-	-	-
E65/E	<i>Penicillium corylophilum</i>	++	-	-	-	+
S105/S	<i>Penicillium</i> sp.	++	-	-	-	+
S181/S	<i>Penicillium</i> sp.	++	-	-	-	+
S98/S	<i>Penicillium</i> sp.	++	-	-	-	+
10ER/S	<i>Periconia algeriana</i>	++	++	+	-	+
E156/E	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	++	+++	-	-
E213/S	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	++	+	++	-	-
EPG1/E	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	+	+	-	+
H7/S	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	++	-	-	-	+
H79/S	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+	-	+	-	+
H80/E	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	++	-	+	-	-
S206/S	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+	-	+	-	+
SPC1/S	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+	-	++	-	-
SPT1/S	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+	-	-	-	-
E218/E	<i>Pestalotiopsis oryzae</i>	+	-	+	-	+
9ER/S	<i>Pithomyces</i> sp.	-	++	+	-	+

E67/E	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	+	-	-	-	-
E63/E	<i>Stemphylium lycopersici</i>	+	-	+	-	+
42RC/S	<i>Subulispora</i> sp.	-	++	+	-	-
8ER/S	<i>Torula</i> sp.	+	-	-	-	++
18ER/S	<i>Trichothecium roseum</i>	+	-	-	-	+

Diversos factores pudieron influir en el resultado de esta evaluación, entre los cuales está el tiempo de crecimiento de las cepas, así como sus adaptaciones biológicas, en específico, el sustrato de donde fueron aisladas y por ende su forma de vida en la naturaleza. Entre las nueve cepas que no tuvieron actividad celulolítica, seis corresponden a especies endófitas, lo que podrían sugerir que para estas especies la síntesis de celulasas no resulta esencial puesto que su nutrición depende más bien de las sustancias que sintetiza la planta (Alam et al., 2021), a diferencia de las especies saprobias que requieren degradar las paredes celulares de las plantas para absorber los carbohidratos y azúcares que requieren para su desarrollo (Walker, 2025). Con excepción de tres cepas saprobias, todas las demás (24) fueron positivas a la producción de celulasas.

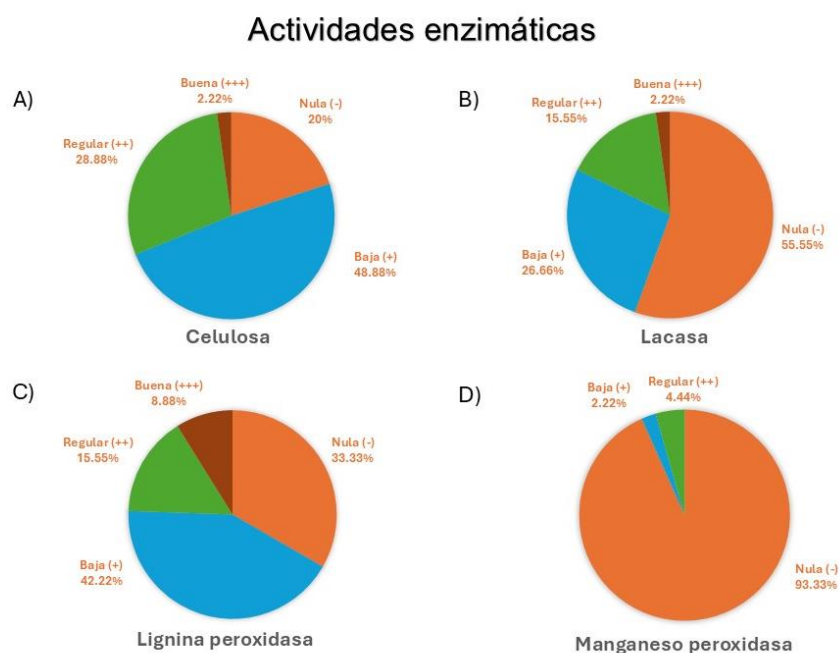


Figura 9. Proporción de especies con y sin actividad en las diferentes enzimas probadas. A) Celulosa. B) Lacasa. C) Lignina peroxidasa. D) Manganese peroxidasa.

Para complementar esta bioprospección la evaluación cuantitativa a diferentes tiempos de desarrollo de las cepas y bajo diferentes tipos de sustratos, temáticas de suma importancia que por cuestiones de tiempo no fueron abordadas en el presente trabajo.

En particular, según la categorización establecida, la cepa E220, con una aproximación taxonómica a *Ceriporiopsis subvermispora*, fue la única que presentó una respuesta cualitativa alta en celulasas. Esta especie, aunque fue encontrada como un endófito en una hoja de una cícada en el presente estudio, ha sido reportada como causante de podredumbre blanca con actividad ligninolítica y celulolítica (Magalhães et al., 2006).

Cabe mencionar que entre las cepas que presentaron una respuesta moderada a la síntesis de celulasas se encuentran dos cepas ubicadas dentro del género *Chaetomium*, en el cual incluyen especies que destacan por su potencial celulítico (Al-Kharousi et al., 2015). Especies de este género han sido reportadas en la literatura con importantes aplicaciones en la biotecnología, ejemplo de ello son las especies *C. variable*, *C. elegans* y *C. fusiforme* por su capacidad para producir celulasas y lacasas, con potencial en la industria de los biocombustibles (Rao et al., 2023). Es interesante resaltar que las especies del género *Chaetomium* no solo sobresalen por su capacidad enzimática, sino que también por la síntesis de otras moléculas dado que, a la fecha, han sido identificados aproximadamente 500 metabolitos de 40 especies de este género, muchos de ellos con actividades biológicas que van desde antitumorales, antiinflamatorias, antimicrobiana hasta resistencia a condiciones adversas y protección a plantas contra otros microorganismos (Rao et al., 2023).

De igual forma las 4 cepas estudiadas del género *Penicillium*, obtuvieron una respuesta celulolítica positiva, cabe mencionar que todas son micromicetos saprobios aislados de suelos agrícolas y de bosque mesófilo, características que seguramente definen su actividad enzimática. El género *Penicillium* es conocido ampliamente dado que una de sus especies fungió como fuente original de la penicilina considerada como el primer antibiótico. Actualmente también es conocido por producir enzimas que degradan proteínas, xilano, almidón y desechos agrícolas (Yoon et al., 2007). En el

caso de las especies del género *Pestalotiopsis*, tres cepas obtuvieron un resultado moderado para la producción de celulasas, dicha actividad ha sido documentada en la literatura, para *Pestalotiopsis versicolor* y *Pestalotiopsis microspora* bajo condiciones de fermentación para evaluar el efecto del pH y la temperatura en su producción (Rao et al., 1983; Goukanapalle et al., 2020). En los últimos años especies del género *Pestalotiopsis* han sido objeto de numerosos estudios, revelando su amplia diversidad y distribución en todo tipo de ecosistemas, a la fecha han sido descritas 457 especies (Index Fungorum, consulta septiembre 2025), de las cuales se han identificado más de 200 metabolitos secundarios con actividades anticancerígenas, antifúngicas, antibacteriana, nematocida, entre otras (Wu, et al., 2022). Cabe mencionar que la mayoría de las especies aún no han sido estudiadas en cuanto a sus capacidades enzimáticas, lo que sugiere la necesidad de explorar la bioprospección y análisis más profundo de *Pestalotiopsis*.

Por otro lado, la cepa 10ER, identificada morfológica y molecularmente como *Periconia algeriana*, también presentó actividad moderada para celulasas. A pesar de que en el género *Periconia* se han descrito 238 especies (Index Fungorum, consulta septiembre 2025), prácticamente se desconoce sus capacidades fisiológicas, únicamente se encontró un reporte para *Periconia epilithographicol* en cuanto a su actividad enzimática celulasa (Rodríguez et al., 2025).

**Lacasas.** Las lacasas fúngicas tienen un amplio espectro en cuanto a su aplicación biotecnológica, así mismo se ha comprobado que tienen un gran potencial en la remoción de compuestos xenobióticos contaminantes en suelo y agua en el área de biotecnología ambiental (Panchal et al., 2024). El 44.4% de las cepas estudiadas presentó en diferente grado una respuesta positiva a la presencia de lacasa (Fig. 9B). De nueva cuenta, como en el caso de la actividad celulasa, la cepa E220, fue la única que presentó una respuesta buena en la categorización de la actividad cualitativa para lacasa. Este resultado refleja la compleja batería enzimática que tiene esta especie, resultado que es congruente con el trabajo de Magalhães (2006) quienes señalan a este hongo como un agente productor de podredumbre blanca. Los datos obtenidos en el presente trabajo evidencian la capacidad de esta especie de transitar de endófito

a saprobio, lo cual ha sido señalado para otras especies endófitas cuya plasticidad es favorecida por su versatilidad enzimática (Lahrmann et al., 2013).

Dentro de la categoría de actividad moderada para lacasa se encuentran siete cepas: *Chaetomium* sp. (S202), *Cladosporium* sp. (7ER), *Myrothecium* sp. (36RC), *Pestalotiopsis* sp. (E156), *Pithomyces* sp. (9ER), *Periconia* sp. (10ER) y *Subulispora* sp. (42RC); de las cuales hasta la fecha solo para especies de los géneros *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Myrothecium* y *Pestalotiopsis* se ha reportado actividad lacasa. Chefetz y colaboradores realizaron el aislamiento de la especie *Chaetomium thermophilum* a partir del compostaje de residuos urbanos, (Chefetz et al., 1998). En el caso de *Cladosporium*, Thrimothi et al. (2023) aislaron de muestras de suelo *Cladosporium cladosporioides*, en dicho estudio los autores posicionan a los hongos microscópicos como una alternativa novedosa para la producción de enzimas ligninolíticas además de los hongos de podredumbre blanca que son tradicionalmente utilizados.

En el caso del género *Myrothecium* se tiene registro que la especie *M. verrucaria* fue estudiada para explorar su rendimiento de producción de la enzima lacasa en medio líquido y utilizando diversas fuentes de carbono naturales como avena y trigo, así como fueron analizados factores como el pH y temperatura (Podieiablonka et al., 2017).

Por su parte, para el género *Pestalotiopsis* un aspecto notable es que la actividad lacasa ha sido detectada tanto en cepas aisladas de suelos terrestres como de sedimentos marinos, lo que revela su versatilidad para colonizar diferentes ecosistemas y la diversidad de su batería enzimática (Maharachchikumbura et al., 2011). Este hallazgo abre nuevas posibilidades para explorar los hongos marinos como una fuente de recursos bióticos con potencial biotecnológico (Feng et al., 2013). En el presente trabajo, la cepa correspondiente a *Pithomyces* (9ER) obtuvo una actividad moderada para lacasa, por el contrario, en un estudio realizado por Uzma y colaboradores (2016) con hongos endófitos de plantas medicinales, los autores no encontraron respuesta positiva para la actividad lacasa en ninguna de las dos especies

del género *Pithomyces* analizadas (Uzma et al., 2016). Lo que demuestra que no es posible generalizar las capacidades enzimáticas de los hongos puesto que al parecer estas son específicas para cada cepa en dependencia de su origen.

También la cepa 10 ER determinada taxonómicamente como *Periconia algeriana* tuvo una actividad lacasa moderada, al respecto no se encontró ningún reporte de la producción de lacasa para especies de este género, por lo que este estudio sería la primera contribución en la que se detecta esta actividad para una especie de este género.

**Lignina peroxidasa.** A esta enzima se le han encontrado diversas aplicaciones industriales, las cuales la vuelven de interés biotecnológico, dado que su uso abarca procesos implicados en la biorrefinería, producción de papel y textiles, biorremediación y productos dermatológicos (Falade et al., 2016).

Después de la actividad celulasa, la presencia de la lignina peroxidasa estuvo presente en más de la mitad de las cepas estudiadas, encontrándose para 4 cepas una respuesta catalogada como buena, siendo la actividad enzimática con mayor número de cepas en esta categoría (Fig. 9C), correspondiendo estas cepas a *Myrmecridium schulzeri* (E215), *Neofusicoccum australe* (E68), *Neopestalotiopsis* sp. (E201) y *Pestalotiopsis* sp. (E156).

De estas, las especies de los géneros *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* han sido reportadas como productoras de lignina peroxidasa, y se les ha atribuido un alto potencial en procesos de biorremediación (Naranjo-Briceño et al., 2006; Khruengsai et al., 2023). Las especies restantes, aún no reportadas para esta actividad, podrían representar nuevas fuentes enzimáticas con aplicaciones relevantes en el ámbito ambiental e industrial.

El género *Myrmecridium* el cual consta de 29 especies descritas (Index Fungorum, consulta septiembre 2025), hasta la fecha ninguna de sus especies ha sido reportada en la literatura con actividad lignina peroxidasa. Recientemente Davi (2024) reportó la actividad productora de celulasa, xilanasas y lipasa de la especie *M. schulzeri* señalándola como una de las dos mejores cepas productoras de enzimas en su



estudio. De igual forma, la especie *M. schulzeri* fue reportada como un microorganismo benéfico en la interacción con la especie de orquídea *Bletilla striata* al mejorar su crecimiento y desarrollo a partir de la producción de ácido indol-3-acético, abriendo nuevas posibilidades para el cultivo de las orquídeas en el mercado (Jiang et al., 2025). Por su parte, el género *Neofusicoccum* el cual también mostró una categoría buena para la actividad lignino peroxidasa, está integrado por 74 especies (Index Fungorum, consulta septiembre 2025). De igual manera, no existe registro sobre la producción de lignina peroxidasa para ninguna de sus especies. Principalmente este género es conocido por su fitopatogenicidad en cultivos como la vid (Massonnet et al., 2017), estilo de vida al que se le atribuye la producción de enzimas que le permiten degradar las barreras vegetales y colonizar a las plantas. Restrepo y colaboradores (2023) estudiaron la actividad enzimática de la especie *N. parvum* la cual mostró producción de xilanasas, endoglucanasas y glucosidasas, sin detección de actividad para lacasas ni peroxidadas. Los autores mencionan que *N. parvum* cuenta con potencial para su uso en la biorrefinación de lignocelulosa.

Las cuatro cepas que presentaron una respuesta buena para la actividad lignino peroxidasa son endófitas, lo cual sugiere realizar estudios más profundos acerca potencial enzimático de este grupo de hongos y de la funcionalidad de este tipo de enzimas en su ciclo de vida.

**Manganeso peroxidasa** A diferencia de otras enzimas, la manganeso peroxidasa ha sido reportada con una distribución más restringida, principalmente entre ciertos basidiomicetos, lo que se traduce en una limitada presencia en micromicetos (Hofrichter, 2002). Esta distribución selectiva podría explicar la baja proporción de cepas con reacción positiva observada en este estudio: únicamente el 2.2% mostró una actividad baja y el 4.44% una actividad moderada (Fig. 9D). Solamente dos cepas del género *Neopestalotiopsis* (E201 y EP3) presentaron una actividad moderada de manganeso peroxidasa, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Khruengsai y colaboradores quienes evaluaron el potencial de biodegradación del polietileno por 65 cepas fúngicas diferentes y encontraron que la

especie *Neopestalotiopsis phangngaensis* mostró la mayor actividad degradadora, así como una alta producción de enzimas lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa (Khruengsai et al., 2023).

De las 11 cepas con respuesta positiva a 3 enzimas sobresalen *Ceriporiopsis subvermispora* (E220), *Myrmecridium schulzeri* (E215) y *Neopestalotiopsis* sp. (E201). La primera por presentar una buena respuesta tanto a celulasa como lignina peroxidasa y las otras dos por su actividad ante la lignina peroxidasa. Motivo por el cual es recomendable profundizar en su actividad enzimática mediante metodologías cuantitativas (Fig. 10).

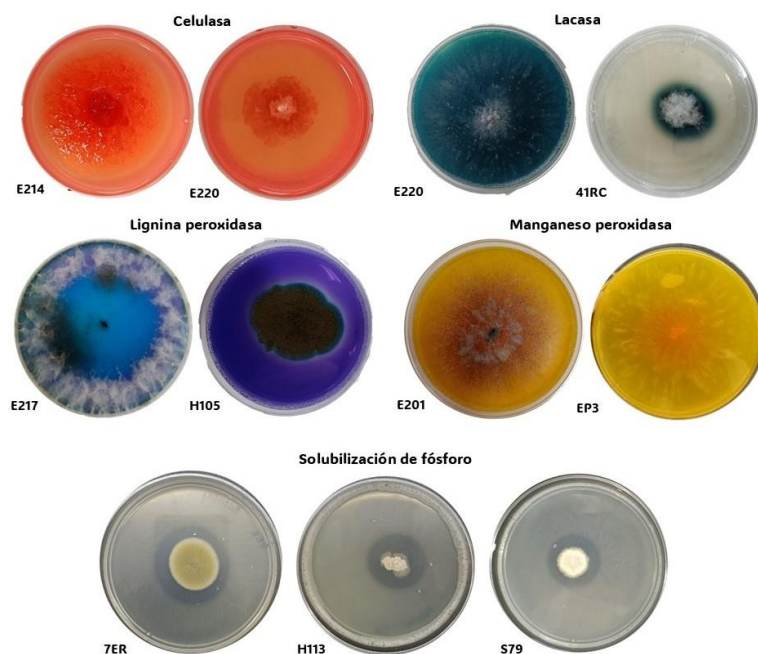


Figura 10. Análisis cualitativos con medios reveladores sólidos para detección de actividad enzimática y solubilización de fósforo.

### 7.1.1. Evaluación cuantitativa de la actividad lacasa

Al realizar la evaluación cuantitativa de las cepas con respuesta regular y buena en la prueba cualitativa de actividad lacasa, y tras la conversión de los valores obtenidos a unidades enzimáticas (U/L), se confirmó que *Ceriporiopsis subvermispora* (E220) presentó la mayor capacidad productora de lacasa, con una actividad de 125.88 U/L, mientras que las demás cepas registraron valores iguales o cercanos a cero. A partir de estos resultados, se sugiere establecer una metodología específica para la producción y purificación de esta enzima a partir de dicha cepa, así como probar medios de cultivo como el Sivakumar para estimular una mayor producción de lacasa.

### 7.2. Detección cualitativa de solubilización de fósforo (SF)

De un total de 45 cepas evaluadas en medio revelador Sundara, 25 formaron un halo de solubilización, de las cuales 17 presentaron baja actividad, 5 actividad moderada y 3 buena actividad (Tabla 2). El empleo de las pruebas reveladoras en medio sólido resulta una prueba de gran ayuda para detectar la SF de forma relativamente rápida y sencilla. Cabe mencionar que el 76% de las cepas con resultado positivo a la SF corresponden a hongos saprobios, capacidad que muy seguramente se debe al estilo de vida pues este tipo de microorganismos habitan suelos y restos vegetales (Crowther et al., 2012) donde el fósforo suele encontrarse inmovilizado, motivo por el cual los hongos han desarrollado estrategias como la producción de ácidos orgánicos y enzimas que les permiten solubilizarlo (Vassileva et al., 2022). El fósforo es esencial para los seres vivos en la formación de ácidos nucleicos, fosfolípidos de membrana y metabolismo energético (Watkinson, 2016).

Las cepas posicionadas en el mayor rango de respuesta cualitativa de solubilización corresponden a *Cladosporium* sp. (7ER), *Gonatobotryum apiculatum* (H105) y *Parascedosporium putredinis* (H113).

*Cladosporium* es un género constituido por 912 especies (Index Fungorum, consulta septiembre 2025), se ha aislado de casi todas las fuentes naturales y

ubicaciones geográficas. Diversas especies de este género han despertado el interés científico por generar metabolitos biológicamente activos con potencial en medicina, industria textil y agrícola (Salvatore et al., 2021). Răut y colaboradores (2021) al evaluar diversas capacidades de tres diferentes cepas de *Cladosporium* sp., obtuvieron resultados prometedores para una de ellas, la cual, además de dar positivo a la solubilización de fósforo y zinc, indujo biocontrol de fitopatógenos y secreción de enzimas hidrolíticas.

En contraste, para *Gonatobotryum apiculatum* (H105) y *Parascedosporium putredinis* (H113) no se encontraron registros previos con esta actividad, por lo que en este estudio se evidencia por primera vez la capacidad solubilizadora de fósforo de ambas especies. Hasta ahora, ambos géneros han sido descritos principalmente como saprobios asociados a restos vegetales (Bangash y Lee, 2025) y en algunos casos especies de *Gonatobotryum* han sido reportadas como fitopatógenas (Gao et al., 2019).

Entre las cepas con actividad cualitativa moderada se encuentran: *Alternaria* sp. (1ER), *Chaetomium* sp. (S77), *Chaetomium* sp. (S79), *Fusarium* sp. (S185) y *Torula* sp. (8ER). El género *Alternaria* está constituido por especies que pueden ser endófitas, patógenas y saprobias con una amplia distribución global (Tralamazza et al., 2018), hasta el día de hoy se conocen alrededor de 878 especies (Index Fungorum, consulta septiembre 2025). Existen pocas investigaciones acerca de la capacidad para SF por parte de especies de *Alternaria*; Ceci y colaboradores (2018) aislaron 30 cepas saprobias de suelo del mediterráneo y entre las que figuran *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*, *Aspergillus niger* y *Alternaria alternata* por su alta capacidad solubilizadora. Los autores mencionan la falta de investigaciones acerca de la SF por parte de hongos saprobios del suelo dado que una gran parte de las investigaciones se centran en especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*.

Con respecto a especies de *Chaetomium*, Tarafdar y Gharu (2006) reportaron para *Chaetomium globosum* en ensayos *in vitro* y en condiciones de invernadero la capacidad de la especie de SF en plantas de trigo. Otro de los hongos con la categoría moderada en la actividad SF, fue la cepa S185 perteneciente al género *Fusarium* el

cual es conocido por causar múltiples enfermedades en plantas y frutos postcosecha, así como por su amplia distribución en el suelo (Patel et al., 2022). Las especies de este género han sido objeto de investigaciones sobre la producción de metabolitos con actividades biológicas como antifúngicas, antimicrobianas, citotóxicas y nematocida (Ibrahim et al., 2021). Además de ello, en menor proporción también se ha evaluado su actividad SF, al respecto Li y colaboradores (2022), aislaron hongos de la rizosfera de diversos cultivos localizados cerca de una zona de explotación minera de fosfato, a los cuales evaluaron su capacidad para solubilizar fósforo y su tolerancia a metales pesados. Entre sus resultados los autores resaltan una disminución de la biodiversidad fúngica en la rizosfera debido a la minería y señalan las cepas *Epicoccum nigrum*, *Penicillium aculeatum* y *Fusarium verticillioides* como solubilizadores de fósforo con buena tolerancia a múltiples metales pesados. Los autores mencionan el posible potencial de estos hongos para la remediación de suelos contaminados y la importancia de sumar recursos fúngicos para la rehabilitación de suelos alterados.

La quinta y última cepa con respuesta moderada corresponde al género *Torula* (8ER), el cual está constituido por 566 especies (Index Fungorum, consulta septiembre 2025), principalmente por individuos saprobios que habitan en lugares húmedos tropicales (Tian et al., 2023). El conocimiento de especies de *Torula* con capacidad SF se limita a la especie *Torula thermophila* aislada de compost (Singh et al., 1980). Ante la falta de investigación de esta actividad generada por las especies de este género, se sugiere estudiar más a fondo, puesto que puede representar un recurso interesante para su aplicación en diversas áreas.

### **7.3. Evaluación cuantitativa de solubilización de fósforo de las cepas con mayor respuesta en prueba cualitativa (SF)**

De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba cualitativa, se seleccionaron las tres cepas con mayor respuesta: *Cladosporium* sp. (7ER), *Gonatobotryum apiculatum* (H105) y *Parascedosporium putredinis* (H113), a las cuales

se les realizó la evaluación cuantitativa de SF en medio líquido, lo cual permitió obtener resultados más robustos y comparar la eficiencia de cada cepa para solubilizar este nutriente en condiciones in vitro (Fig. 11A).

Las cepas correspondientes a *Gonatobotryum apiculatum* (H105) y *Parascedosporium putredinis* (H113) registraron las concentraciones más altas de fósforo soluble en el presente ensayo. La cepa H105 presentó un rango de solubilización de 47.29 a 98.31 mg/L, con un promedio de 81.35 mg/L, mientras que H113 mostró un rango de 59.50 a 101.27 mg/L y un promedio de 84.12 mg/L. Ambas alcanzaron su valor máximo el día 20 y exhibieron una dinámica de solubilización semejante durante el experimento, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas ( $p = 0.2366$ ) (Fig. 11B). Es importante reiterar que este estudio constituye el primer reporte de solubilización de fósforo para *Gonatobotryum apiculatum* y *Parascedosporium putredinis*. Por tal motivo, no es posible establecer comparaciones directas con la literatura previa sobre estas especies. No obstante, con el fin de situar los resultados obtenidos en este trabajo en un marco de referencia, los valores fueron contrastados con reportes disponibles para otros hongos saprobios nativos de México en diversas investigaciones, las cuales se presentan a continuación. Hernández y colaboradoras (2011) reportaron la capacidad de SF para una cepa de *Paecilomyces lilacinus* aislada del Cofre de Perote, Veracruz. Dicha cepa alcanzó una solubilización de 71.28 mg/L; además, las autoras mencionan que este hongo, conocido por su uso en el control de nematodos, puede favorecer la disponibilidad de fósforo en el suelo y resaltan la necesidad de realizar experimentos en invernadero y campo. El valor mostrado por *P. lilacinus* es aproximadamente un 15% más bajo que el obtenido por las cepas H105 y H113.

Otro ejemplo es la investigación realizada por Romero y colaboradores (2019), consistente en el aislamiento de hongos de suelo de diversos sitios de Coahuila, a los que se les valoró cualitativa y cuantitativamente la SF. En esta investigación, de un total de 271 aislamientos fúngicos más del 50% obtuvieron respuesta positiva a la capacidad fosfato solubilizadora. Los autores reportan una cepa del género *Penicillium* con la mayor actividad SF, con una concentración de 83.26 mg/L de fósforo soluble,

valor cercano a los rangos obtenidos por los hongos con mayor actividad del presente trabajo.

Por su parte, Arias y colaboradores (2023) realizaron el aislamiento de hongos a partir de suelo de cafetales y bosque de niebla en el centro de Veracruz, evaluando su actividad SF. Entre los aislamientos, las cepas correspondientes a *Aspergillus niger* y *Penicillium waksmanii* registraron las concentraciones más altas, alcanzando hasta 98.22 y 95.77 mg/L, respectivamente. Estos valores superan cerca de un 12% a los obtenidos por *Gonatobotryum apiculatum* y *Parascedosporium putredinis*. Dicho resultado abre una nueva ventana de posibilidades para explorar especies fuera de los géneros tradicionalmente empleados en la solubilización de fósforo, ya que nuestros aislados mostraron desempeños cercanos a los alcanzados por especies generalmente utilizadas para esta actividad.

En cuanto a la cepa 7ER perteneciente a *Cladosporium* sp. mostró un rendimiento significativamente más bajo comparado con las cepas H105 y H113 (Fig. 11A y 11B), con un rango de 8.39 mg/L a 79.18 mg/L, presentando su valor más alto también el día 20 y un promedio de 42.42 mg/L. En una investigación reciente realizada por de Souza y colaboradores (2025) aislaron una cepa de *Cladosporium* sp. de sedimento antártico y de un total de 80 aislamientos fúngicos, esta cepa mostró la mejor capacidad de SF al mostrar una concentración de 137.93 mg/L de fósforo soluble, además se reportó la producción de ácidos como el fumárico y málico por parte del hongo.

Cabe mencionar que la cepa 7ER en el día 25 mostró una disminución en la concentración de P soluble, fenómeno que ha sido reportado en la literatura, Elias y colaboradores (2016) lo atribuyen a diferentes causas como lo es la disponibilidad de P soluble que puede fungir como un efecto inhibidor sobre una mayor solubilización o de igual forma al agotamiento de la fuente de carbono que limita la producción de ácidos orgánicos. Además, los autores mencionan que la aparición del halo hialino en

la prueba cualitativa no garantiza una eficiencia en la actividad en medio líquido, es decir, la técnica en medio sólido debe complementarse con la cuantificación si se requiere hacer un estudio más profundo.

A lo largo del experimento se monitoreo el pH, lo cual reveló diferencias importantes entre los tratamientos con hongos y el testigo (9C). En general, las cepas evaluadas tendieron a disminuir el pH del medio, lo cual concuerda con la literatura, donde se menciona que la acidificación del medio es consecuencia del metabolismo fúngico, principalmente relacionado con el mecanismo de producción de ácidos orgánicos (Beltrán, 2014). Desde el inicio, el cultivo de la cepa H113 (*Parascedosporium putredinis*) mostró el pH más bajo y mantuvo una tendencia descendente pronunciada a lo largo del tiempo, alcanzando un valor cercano a 5 al día 25. La cepa 7ER (*Cladosporium* sp.) también tuvo una tendencia a la disminución del pH, aunque en menor grado. En contraste, la cepa H105 (*Gonatobotryum apiculatum*) presentó una dinámica distinta: su pH disminuyó al día 15, pero posteriormente se incrementó hacia el día 25. El testigo mantuvo un pH estable durante todo el experimento, lo que confirma que los cambios en pH observados en los tratamientos fueron inducidos por la actividad fúngica.

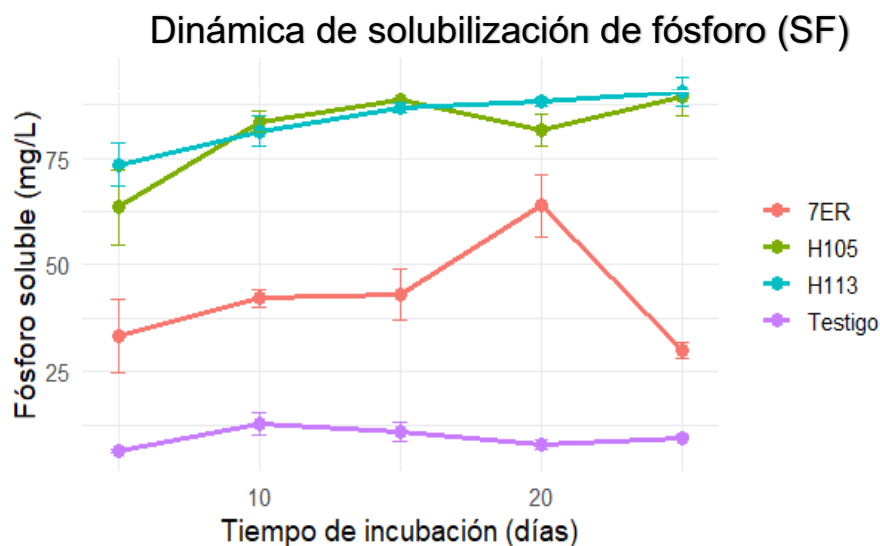


Figura 11A. Dinámica de solubilización de fósforo (SF) en medio líquido durante 25 días.



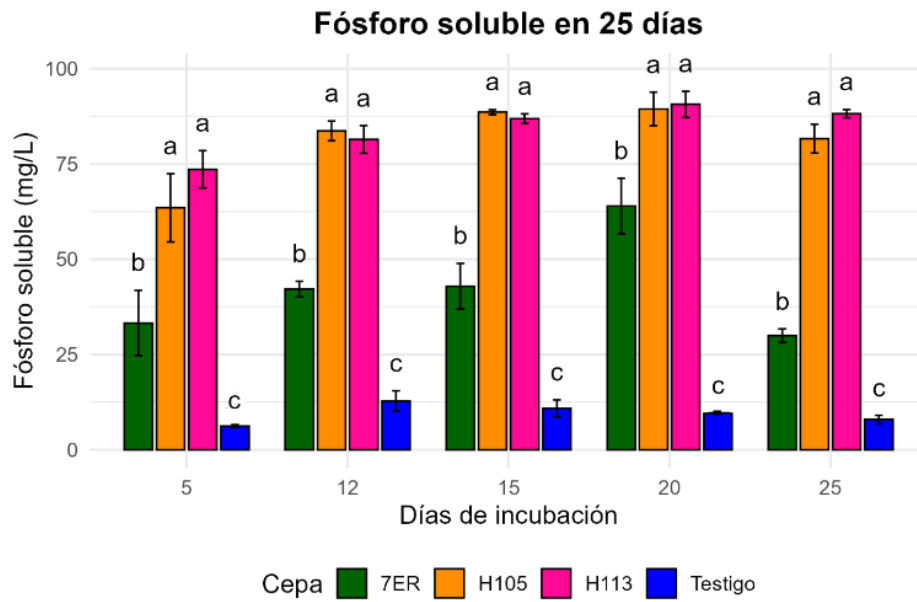


Figura 11B. Prueba Tukey de la actividad SF durante 25 días.

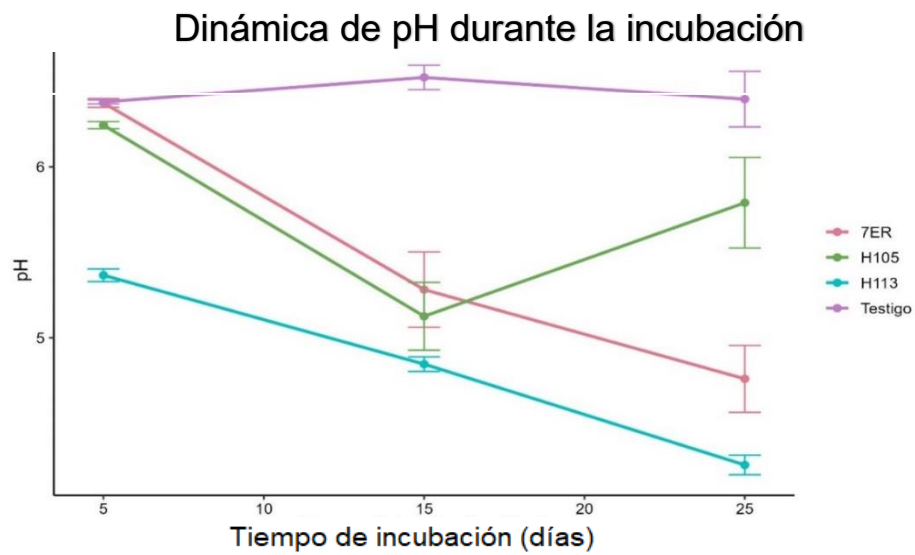


Figura 11C. Dinámica del pH en los medios líquidos durante la incubación en 25 días.

## 7.4. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento vegetal

### 7.4.1. Arquitectura de la raíz

Los parámetros evaluados dentro de la arquitectura de la raíz fueron: longitud de la raíz primaria, número de raíces laterales y densidad de raíces laterales.

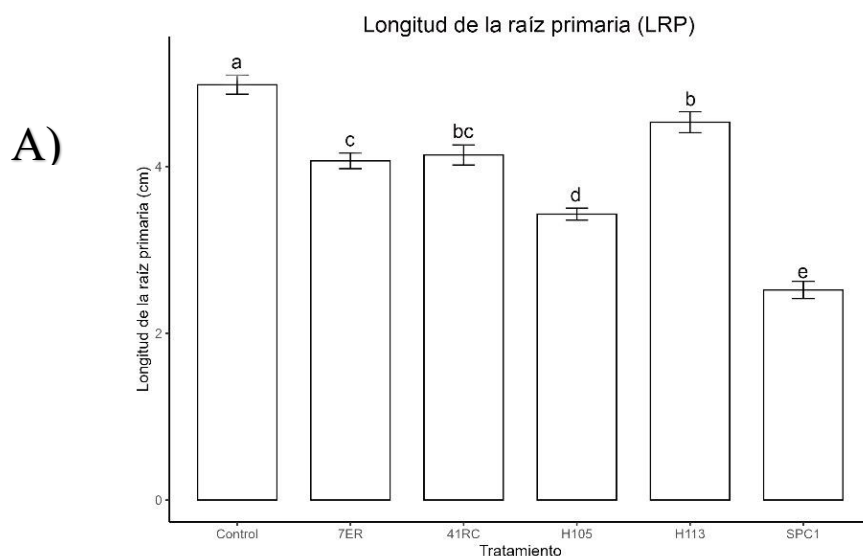
Para el caso de la longitud de la raíz primaria (LRP), todos los tratamientos fúngicos disminuyeron significativamente este valor en comparación con el testigo. El control, es decir, el tratamiento sin ningún tipo de inoculación presentó la mayor LRP, mientras que el tratamiento SPC1 correspondiente a *Pestalotiopsis* sp. mostró una disminución del 49.43% en comparación al testigo. En orden descendente, las reducciones en LRP, respecto al control fueron del 31.17% para H105 (*Gonatobotryum apiculatum*), 18.33% para 7ER (*Cladosporium* sp.), 16.92% para 41RC (*Arthrinium* sp.) y 9.03% para H113 (*Parascedosporium putredinis*). En base al análisis estadístico, los tratamientos se agruparon en distintas letras según la prueba de Tukey, confirmando diferencias significativas entre ellos (Fig. 12A). Podemos notar que, el tratamiento con la cepa H113 se ubica como la estadísticamente más cercana al control, lo que sugiere un efecto menos marcado en la reducción del LRP.

El análisis de número de raíces laterales (NRL) mostró diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos. La interacción hongo-planta de la cepa 41RC (*Arthrinium* sp.) mostró el mayor resultado de NRL, con un promedio de 14, seguido de 7ER (*Cladosporium* sp.) con un promedio cercano a 12, por lo que no existe una diferencia significativa entre ellos. Los tratamientos SPC1 y H105 también incrementaron el NRL en comparación con el testigo, por lo que se puede denotar que todos los tratamientos aumentaron el NRL (Fig. 12B).

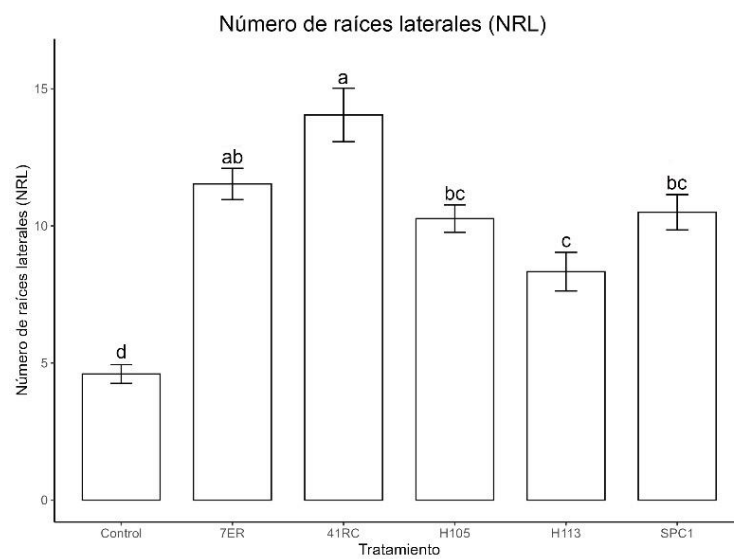
Se observaron diferencias estadísticamente relevantes en la densidad de raíces laterales (DRL) entre los distintos tratamientos evaluados. La mayor DRL fue registrada en el tratamiento SPC1 (*Pestalotiopsis* sp.), con un promedio cercano a 4 raíces por centímetro, un rango mayor a todos los demás tratamientos. Le siguieron los

tratamientos 41RC (*Arthrinium* sp.), H105 (*Gonatobotryum apiculatum*), 7ER (*Cladosporium* sp.) y por último H113 (*Parascedosporium putredinis*). El control mostró la menor densidad de raíces laterales, posicionando a todos los tratamientos como promotores de raíces laterales (Fig. 12C).

La disminución de la longitud de la raíz primaria (LRP) en experimentos de interacción hongo-planta in vitro ha sido reportada en diversas ocasiones, y suele ir acompañada por una proliferación de raíces laterales. Un ejemplo claro de este patrón fue documentado por Nieto y colaboradores (2017), quienes inocularon *Arabidopsis thaliana* in vitro con *Trichoderma* sp., observando una reducción del LRP entre un 13% y un 25%, junto con un incremento del número de raíces laterales del 64% hasta un 90%. Este efecto conjunto se tradujo en un aumento considerable de la densidad radicular. Estos efectos pueden deberse a la acción de fitohormonas, principalmente auxinas, que puede inhibir el crecimiento de la raíz primaria y estimular la formación de raíces laterales, pero, también podría deberse por compuestos orgánicos producidos por los hongos que pueden modificar el desarrollo radicular (Contreras, et al., 2009). Las raíces laterales son fundamentales para la arquitectura del sistema radicular, ya que no solo mejoran la eficiencia en la absorción de agua y nutrientes, sino que también proporcionan un soporte mecánico adicional a la planta. Debido a su relevancia en el desarrollo vegetal, se ha enfocado la atención en identificar microorganismos capaces de estimular su formación (Vacheron et al., 2016).



B)



C)

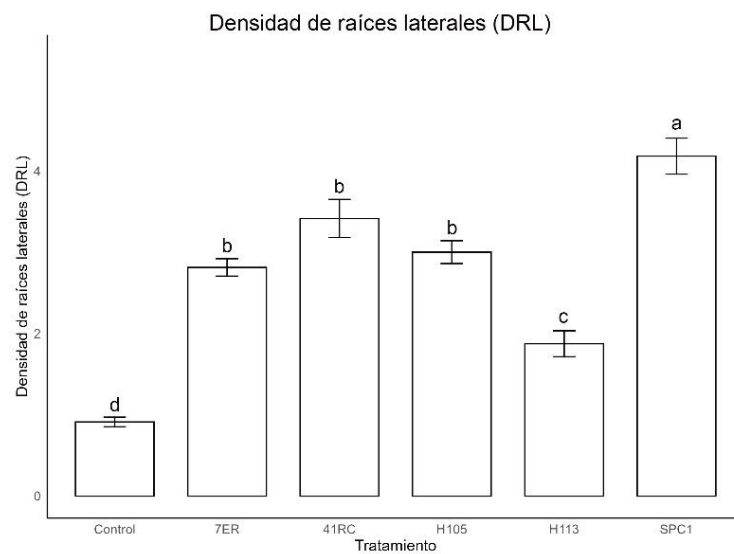


Figura 12. Arquitectura de la raíz. A. Largo de la raíz primaria. B. Número de raíces laterales. C. Densidad de raíces laterales.

#### 7.4.2. Biomasa

El desarrollo radicular de *A. thaliana* se vio favorecido por la inoculación con las cepas fúngicas evaluadas (Fig. 13A). Destacó la cepa 7ER (*Cladosporium* sp.), que alcanzó el mayor valor promedio de peso fresco radicular (18.17 mg), representando un incremento del 88.7 % respecto al control (9.63 mg), siendo este el único tratamiento con diferencia estadísticamente significativa. Por su parte, la cepa 41RC (*Arthrinium* sp.) también mostró un incremento notable (56.3 %), aunque sin significancia estadística. Las cepas H113, H105 y SPC1 presentaron valores superiores al testigo, sin diferencias significativas entre ellas, aunque reflejan una tendencia positiva en la biomasa radicular. Asimismo, se observó una aparición masiva de pelos radiculares, principalmente en la raíz primaria de las plantas inoculadas con hongos, fenómeno que no se presentó con la misma intensidad en las plantas del tratamiento control, destacando la interacción H105-planta (Tabla 3).
















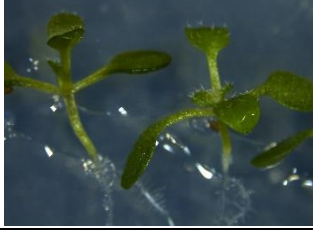


En cuanto a la biomasa aérea, todos los tratamientos fúngicos promovieron un mayor peso fresco foliar en comparación con el control (Fig. 13B). Mientras que el testigo presentó un valor promedio de 33.53 mg, la cepa 7ER (*Cladosporium* sp.) incrementó el peso foliar en un 59.2 %, y 41RC (*Arthrinium* sp.) en un 59.6 %, siendo ambos los tratamientos con mayor efecto positivo. Estos resultados posicionan a dichas cepas como potenciales bioestimulantes de la biomasa aérea. Aunque los demás tratamientos también generaron aumentos en el peso foliar, sus diferencias no fueron estadísticamente significativas frente al control.

En los tratamientos evaluados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de clorofila por miligramo de tejido foliar (Fig. 13C). No obstante, todos los tratamientos con hongos mostraron valores ligeramente superiores al control (0.1858 mg), siendo el tratamiento SPC1 (*Pestalotiopsis* sp.) el que presentó el valor promedio más alto (0.2217 mg), seguido de H113 (*Parascedosporium putredinis*) (0.2184 mg), 41RC (*Arthrinium* sp.) (0.2141 mg) y H105 (*Gonatobotryum apiculatum*) (0.2019 mg).

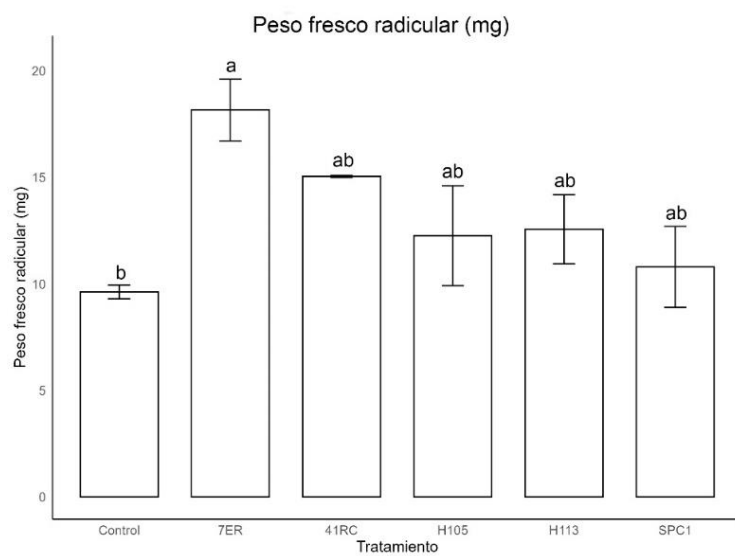
El incremento del peso radicular y foliar en plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con hongos ha sido ampliamente reportado, especialmente en géneros como *Trichoderma* y *Penicillium*. No obstante, también se ha observado en otros hongos no tradicionales, como *Cyanodermella asteris*, donde, al igual que en el presente estudio, el aumento del peso radicular se atribuyó a la sobreproducción de raíces laterales en plantas inoculadas (Jahn et al., 2021). Este incremento en la biomasa vegetal, tanto radicular como foliar, puede estar mediado por compuestos orgánicos volátiles (COVs) emitidos por los hongos, los cuales han sido descritos como uno de los principales mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (Halifu, et al., 2019).

Para el caso de la clorofila en este estudio, los tratamientos no mostraron incrementos estadísticamente significativos para la concentración de esta sustancia, pero este efecto se ha visto anteriormente, pues en un estudio realizado a diferentes cultivos agrícolas inoculados con hongos, solo se reportó el incremento de la clorofila entre un 9% a 17% (Brazhnikova et al., 2021). Esto sugiere que la estimulación en una mayor concentración de clorofila no es universal en la interacción hongo-planta y podría depender la especie de la cepa, la planta huésped, las condiciones ambientales, entre otras.

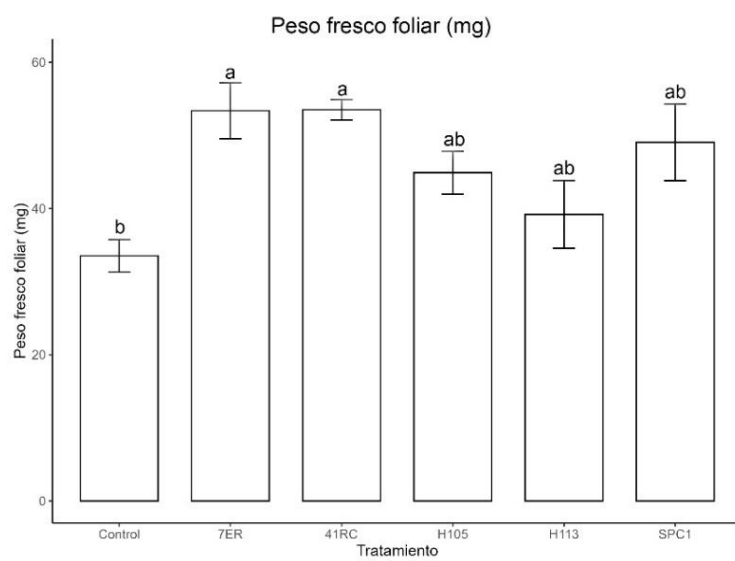
Tabla 3. Imágenes de follaje, raíz primaria y raíces laterales de *Arabidopsis thaliana* transcurridos 5 días de la inoculación hongo-planta.

	Follaje	Raíz primaria	Raíces laterales
<b>Control</b>			
<b>7ER</b>			
<b>41RC</b>			
<b>H105</b>			
<b>H113</b>			
<b>SPC1</b>			

A)



B)





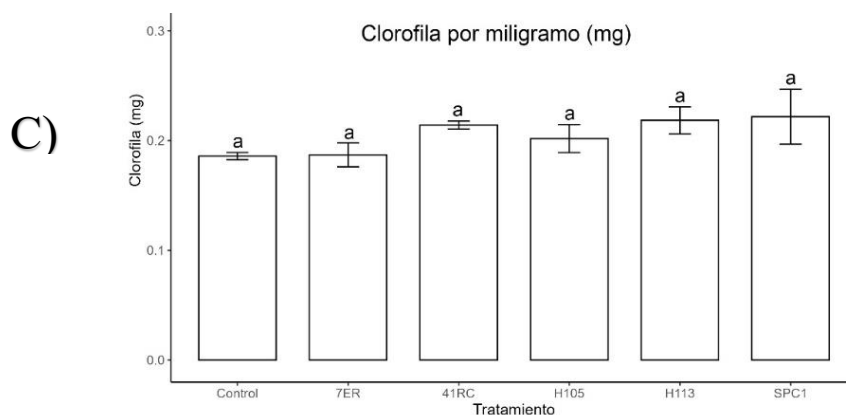


Figura 13. Biomasa. A. Peso fresco radicular. B. Peso fresco foliar. C. Clorofila

#### 7.4.3. Visualización de la actividad auxínica

Finalmente, se empleó la prueba visual utilizando X-Gluc para evaluar la posible sobreproducción de auxinas en *Arabidopsis thaliana*, basada en la expresión reportero DR5:GUS (Tabla 3). Sin embargo, no presentaron tinciones azules con diferencias significativas al testigo, lo que podría indicar una baja o nula inducción de auxinas por parte de las cepas fúngicas evaluadas. Especies del género *Trichoderma* y *Penicillium* han reportado una actividad positiva para la producción de este fitorregulador (Contreras, et al., 2009). Aunque no existió una respuesta contundente sobre la actividad auxínica, esto no limita la promoción de crecimiento vegetal de estas cepas, pues existen múltiples vías mediante las cuales estos micromicetos pueden estimular el desarrollo vegetal. Entre ellas se encuentra la emisión de compuestos volátiles orgánicos, solubilización de nutrientes y modulación de otros reguladores de crecimiento distintos a las auxinas (Díaz et al., 2024; Cui et al., 2025).

Uno de los fenómenos más notables se presentó en la interacción de la cepa SPC1 (*Pestalotiopsis* sp.), donde la terminación de la raíz primaria desarrolló una curvatura, orientando su ápice en dirección opuesta al punto de inoculación. Este patrón se observó consistentemente en todos los individuos del tratamiento. Además,

el meristemo apical presentó una coloración verde pálida en la prueba de actividad auxínica, indicativa de muerte celular. El tratamiento SPC1 presentó tres características distintivas: 1) menos longitud de raíz primaria, 2) alto número y densidad de raíces laterales y 3) terminación de la raíz en forma de “gancho”. Este conjunto de características fue previamente reportado por Pelagio y colaboradores (2017) en *A. thaliana* inoculada con *Trichoderma atroviride*, donde se concluyó que la acidificación del medio por el hongo reprimía el crecimiento radicular al afectar la funcionalidad del meristemo. A partir de este antecedente, es posible inferir que la cepa SPC1 podría inducir un fenómeno similar mediante la acidificación del medio de cultivo.

Todos los hongos evaluados tuvieron algún efecto sobre el desarrollo vegetal de *Arabidopsis thaliana* (Fig.14), aunque con distinta magnitud, por lo que representan candidatos prometedores para investigaciones más profundas que permitan evaluar su capacidad promotora del crecimiento vegetal en condiciones de invernadero.

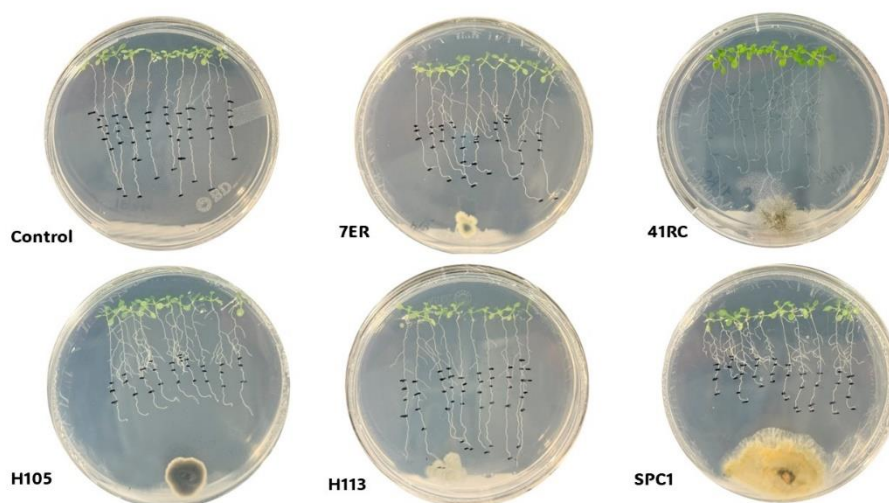







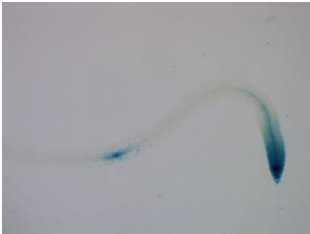












Figura 14. Interacción hongo-planta a 5 días de su inoculación

Tabla 4 Imágenes de follaje, raíz primaria y raíces laterales de *Arabidopsis thaliana* mostrando respuestas auxínicas.

	Follaje	Raíz primaria	Raíces laterales
<b>Control</b>			
<b>7ER</b>			
<b>41RC</b>			
<b>H105</b>			
<b>H113</b>			
<b>SPC1</b>			

En particular, *Gonatobotryum apiculatum* y *Parascedosporium putredinis* no habían sido previamente reportados como hongos promotores del crecimiento, lo que abre una nueva línea de investigación en torno a micromicetos nativos de México con potencial agrícola. Por otro lado, si bien el género *Arthrinium* ha sido descrito como productor de fitohormonas (Khan et al., 2009), aún carece de estudios experimentales más complejos. En este trabajo, *Arthrinium* sp. destacó como un excelente candidato para futuras investigaciones en este ámbito. En la búsqueda de especies potenciales para su investigación y uso para la promoción de crecimiento vegetal existen características deseables: a) alto grado de esporulación, b) desarrollo de micelio para ser accesible su manejo, c) poco o nulo cambio morfológico del hongo y d) que no muestre un estado de latencia imposibilitando su cultivo. Todos las cepas utilizadas en este estudio presentaron estas características, lo que amplía el interés en su estudio.

Esta investigación resalta el gran potencial de los micromicetos nativos para atender las necesidades del campo mexicano, promoviendo un uso más diverso y adaptado de especies fúngicas en el territorio nacional. En la actualidad, tanto en México como a nivel mundial, los hongos del género *Trichoderma* son los más empleados para enfrentar problemáticas agrícolas (Tyśkiewicz et al., 2022). No obstante, aún se desconoce el impacto ecológico que podría derivarse de su uso extensivo y repetido en los suelos. Una de las principales preocupaciones radica en el posible desplazamiento de micromicetos nativos frente a *Trichoderma*, lo cual subraya la necesidad urgente de generar investigación tanto básica como aplicada sobre la biodiversidad fúngica y sus usos potenciales en la agricultura sustentable.

## 8. CONCLUSIONES

Todas las cepas de los hongos microscópicos estudiados presentaron respuesta positiva al menos a una de las capacidades fisiológicas evaluadas, con distintos niveles de expresión en cada una de ellas. En la actividad enzimática, más de la mitad de las cepas mostraron resultados positivos al menos para una enzima, lo que evidencia su potencial como fuente de enzimas de interés biotecnológico. Entre las cepas más destacadas se encuentran *Cerisporiopsis subvermispota* (E220), *Myrmecridium schulzeri* (E215) y *Neopestalotiopsis* sp. (E201), por tener actividad positiva en la producción de tres enzimas y particularmente por su actividad celulasa y lignina peroxidasa. Las tres cepas son endófitas, lo que sugiere explorar con mayor profundidad la batería enzimática con la que cuentan las especies que se encuentran en este estilo de vida. En particular, tras la evaluación cuantitativa de la actividad lacasa, se visualizó el potencial de *Cerisporiopsis subvermispota* (E220) como fuente prometedora de esta enzima; por ello, se recomienda desarrollar metodologías eficientes para su cultivo, así como para la producción y purificación de la lacasa.

En cuanto a la actividad para la solubilización de fósforo, poco más de la mitad de las cepas formaron un halo de solubilización, siendo la mayoría de estos hongos saprobios. Las cepas con la mejor respuesta en la evaluación cualitativa fueron *Cladosporium* sp. (7ER), *Gonatobotryum apiculatum* (H105) y *Parascedosporium putredinis* (H113). Siendo las dos últimas (H105 y H113) las que indujeron las mayores concentraciones de fósforo soluble en la evaluación cuantitativa, estos resultados son básicos para futuras investigaciones a nivel invernadero, con el fin de evaluar su actividad solubilizadora ante la interacción con plantas y con el ambiente físico y biológico del suelo.

Por su parte, en la evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal, las 5 cepas seleccionadas provocaron algún tipo de respuesta en los diferentes parámetros medidos. Las cepas 41RC (*Arthrinium* sp.) y 7ER (*Cladosporium* sp.)

mostraron el mayor efecto de promoción del crecimiento vegetal, al generar una alta inducción de raíces laterales y un incremento significativo del peso foliar, ambas especies con una forma de vida saprofita, lo que abre nuevas posibilidades para el uso de micromicetos saprobios en la agricultura diferentes a las especies tradicionalmente empleadas como por ejemplo *Trichoderma harzianum*.

Los resultados de este estudio ponen sobre relieve la importancia de explorar hongos con diferentes formas de vida; de las especies estudiadas se desprende que las cepas endófitas tuvieron mayor respuesta a la actividad enzimática mientras que las saprobias presentaron mejores resultados en la solubilización de fósforo. A partir de los resultados obtenidos en la interacción hongo-planta, se propone realizar bioensayos complementarios en condiciones de invernadero utilizando especies vegetales de interés agrícola, con el fin de validar el efecto promotor observado in vitro. De igual forma, se considera importante ampliar los bioensayos con las cepas de hongos endófitos, con el propósito de estudiar el tipo de interacción que establecen con las plantas y determinar si tienen efecto de promoción vegetal.

Este tipo de estudios son fundamentales para ampliar el conocimiento sobre la capacidad fisiológica de los hongos microscópicos nativos y establecer las bases para valorar su potencial biotecnológico. Para ello, resulta indispensable el fortalecimiento de colecciones de cultivos (ceparios) provenientes de hongos nativos con diferentes formas de vida y aislados de una amplia diversidad de ambientes ecológicos. Dada la complejidad y diversidad de estos microorganismos, su estudio debe abordarse desde una perspectiva holística que integre disciplinas como la micología, ecología, biología molecular, edafología, química, biotecnología, entre otras. Paralelamente es importante el desarrollo de metodologías para su aislamiento, conservación en laboratorio y evaluación de sus actividades biológicas. Los micromicetos poseen un fascinante y complejo metabolismo que les ha conferido plasticidad y un gran éxito de sobrevivencia, comprenderlo a fondo representa un paso clave hacia su aprovechamiento.

## 9. REFERENCIAS

- Alam B., Lǐ, J., Ge Q., Alam M. A., Gōng J., Mehmood S., Yuán Y. y Gōng W. (2021). Endophytic fungi: from symbiosis to secondary metabolite communications or vice versa? *Frontiers in Plant Sciences*. 12, 791033.
- Al-Kharousi, M. M., Sivakumar, N. y Elshafie, A. (2015). Characterization of cellulase enzyme produced by *Chaetomium* sp. isolated from books and archives. *EurAsian Journal of BioSciences*. 9, 52-60.
- Arámbula, C. C. (2017). *Interacciones interespecíficas entre hongos de la pudrición blanca y microscópicos de suelo: estrategia para incrementar la producción de enzimas ligninolíticas* [Tesis de licenciatura, Universidad de Colima].
- Arias, R. M., Heredia, G., Perea, Y., de la Cruz, Y. y García Guzmán, K. Y. (2023). Selection and characterization of phosphate-solubilizing fungi and their effects on coffee plantations. *Plants*. 12, 3395.
- Asgher, M., Bashir, F. & Iqbal, H. M. N. (2014). A comprehensive ligninolytic pre-treatment approach from lignocellulose green biotechnology to produce bio-ethanol. *Process Safety and Environmental Protection*. 1571-1578.
- Aza, P., y Camarero, S. (2023). Fungal laccases: fundamentals, engineering and classification update. *Biomolecules*. 13(12), 1716.
- Bangash, N. K. y Lee, H. B. (2025). A new species and a new record of *Graphium* from freshwater environment in Korea. *Mycobiology*. 53(3), 2450892.
- Begonia, M. T., Begonia, G. B., Miller, G., Gillard, D. y Young, C. (2004). Phosphatase activity and populations of microorganisms from cadmium- and lead-contaminated soils. *Bullet of Environmental Contamination and Toxicology*. 73(1), 1025-1032.
- Beltrán, M. E. (2014). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia en Desarrollo*. 5(2), 145-154.

- Bent, E. (2006). Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). En S. Tuzun, E. Bent (Eds.) *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*.
- Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, H. M. N., Hu, H. y Zhang X. (2017). Delignification and fruit juice clarification properties of alginate-chitosan-immobilized ligninolytic cocktail. *Food Science and Technology*. 80,1, 348-354.
- Borkakoti, N., Ribeiro, A. J. M. y Thornton, J. M. (2025). A structural perspective on enzymes and their catalytic mechanisms. *Current Opinion on Structural Biology* 92, 103040.
- Brazhnikova, Y., Ignatova, L., Omirbekova, A., Mukasheva, T., Kistaubayeva, A., Savitskaya, I., Egamberdieva, D., Usmanova, A. y Batlutskaya, I. (2021). Effect of plant growth promotion fungi on agricultural crops. *BIO Web of Conferences*. 40, 01004.
- Castillo, J. F., Bandala, V. M., Ramos, A., Desgarennes, D., Carrión, G., César, E., Montoya, L., y Ortiz, R. *Pisolithus tinctorius* extract affects the root system architecture through compound production with auxin-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *Rhizosphere*. 19, 100397.
- Ceci, A., Pinzari, F., Russo, F., Maggi, O. y Persiani, A. M. (2018). Saprotrophic soil fungi to improve phosphorus solubilization and release: In vitro abilities of several species. *Ambio* 47(1), 30–40.
- Chefetz, B., Chen, Y. y Hadar, Y. (1998). Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 3175-3179.
- Chowdhary, P., Hare, V., Mani, S., Singh, A. K., Zainith, S., Raj, A. y Pandit, S. (2020). Recent advancement in the biotechnological application of lignin peroxidase and its prospects. En P. Chowdhary, A. Raj, D. Verma, Y. Akhter (Eds). *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*. Elsevier.



- Contreras, H. A., Macías, L., Cortés, C. y López, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 149, 1579-1592.
- Copetti, M. V. (2019). Fungi as industrial producers of food ingredients. *Current Opinion in Food Science*. 25, 52–56.
- Cui, H., Cheng, Q., Jing, T., Chen, Y., Li, X., Zhang, M., Qi, D., Feng, J., Vafadar, F., Wei, Y., Li, K., Zhao, Y., Zhou, D. y Xie, J. (2025). *Trichoderma virens* XZ11-1 producing siderophores inhibits the infection of *Fusarium oxysporum* and promotes plant growth in banana plants. *Microbial Cell Factories*. 24, 22.
- Davi, L. (2024). Diversity and Biotechnological Potential of Endophytic Fungus from the medicinal plant *Bauhinia forficata*. *International Journal of Bacteriology and Mycology*. 12(1), 1-8.
- de Souza Silva, A. V., da Silva, A. V., de Oliveira, A. J., da Silva Costa, R. F., Alves, R. P., Rosa, L. H., de Oliveira, V. M., da Silva Cáceres, M. E., Cavalcante, J. G., Cavalcante, S. B., Passarini, M. R. Z., de Queiroz, A. C., y Duarte, A. W. F. (2025). Phosphate solubilization by filamentous fungi from Antarctic lichens and sediments. *Extremophiles*. 29(2), 26.
- Deckers, M., Deforce, D., Fraiture, M. A. y Roosens, N. H. C. (2020). Genetically modified micro-organisms for industrial food enzyme production: an overview. *Foods*. 9(3), 326.
- Díaz, C., Deramond, C., Machuca, Ángela, y Chávez, D. (2024). Actividad promotora del crecimiento vegetal de cuatro hongos endófitos aislados desde *Araucaria araucana*. *Siembra*. 11(2), e6802.
- Elias, F., Woyessa, D. y Muleta, D. (2016). Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma Zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*. 5471601.

- Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V. y Okoh A. I. (2016). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiology Open*. 2016, 1-14.
- Feng, X., Cheng, H., Dongsheng, X. & Yao, S. (2013). Enhancement of laccase activity by marine-derived Deuteromycete *Pestalotiopsis* sp. J63 with Agricultural Residues Inducers. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 21(10), 1182-1189.
- Gams, W. (1992). The analysis of communities of saprophytic microfungi with special reference to soil fungi. En W. Winterhoff (Ed). *Fungi in Vegetation Science*. Kluwer Academic Publishers.
- Gao, Y., Liu, H. F., Song, Z. X., Du, X. Y., y Deng, J. X. (2019). Identification and characterization of *Gonatobotryum apiculatum* causing leaf spot and blight on *Sinowilsonia henryi*. *Mycobiology*. 48(1), 70–74.
- Goukanapalle, P. K. R., Kanderi, D. K., Rajoji, G., Kumari, B. S. S. y Bontha, R. R. (2020). Optimization of cellulase production by a novel endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* TKBRR isolated from Thalakona forest. *Cellulose*. 27, 6299-6316.
- Hage, H. y Rosso, M. N. (2021). Evolution of fungal carbohydrate-active enzyme portfolios and adaptation to plant cell-wall polymers. *Journal of Fungi*. 7(3), 185.
- Halifu, S., Deng, X., Song, X. & Song, R. (2019). Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*. Annual Seedlings. *Forests*. 10, 758.
- Heredia Abarca, G. (Ed.) (2008). *Tópicos sobre diversidad, ecología y uso de los hongos microscópicos en Iberoamérica*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) e Instituto de Ecología, A. C.
- Hernández, T. I., Carrión, G. y Heredia, G. (2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*. 45(8), 881-892.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1990). *El reino de los hongos. Micología básica y aplicada*. Fondo de Cultura Económica.

- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30, 454-466.
- Hossain M. B. y Sattar, M. A. (2014). Effect of inorganic phosphorus fertilizer and inoculants on yield and phosphorus use efficiency of wheat. *Journal of Environmental Science & Natural Resources*. 7(1), 75-79.
- Hossain, M., Sultana F. y Islam, S. (2017). Plant growth-promoting fungi (PGPF): phytostimulation and induced systemic resistance. En D. Singh, H. Singh, R. Prabha (Eds.). *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*.
- Hyde, K.D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T., Abeywickrama, P. D., Aluthmuhandiram, J. V. S., Brahamanage, R. S., Brooks, S., Chaiyasen, A., et al. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*. 97, 1-136.
- Index Fungorum. [consulta septiembre 2025].  
<https://www.indexfungorum.org/names/names.asp>
- Jahn, L., Hofmann, U. y Ludwig-Müller, J. (2021). Indole-3-acetic acid is synthesized by the endophyte *Cyanoderma asteris* via a tryptophan-dependent and independent way and mediates the interaction with a non-host plant. *International Journal of Molecular Sciences*. 22, 2651.
- Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. *IntechOpen*.
- Jiang, T., Xu, Q., Zhang, J., Fu, Y., Yuan, Q., Zhou, T., y Xiao, C. (2025). *Myrmecridium schulzeri* B-4 promotes the growth of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. through the production of IAA. *Industrial Crops and Products*, 233, 121324.
- Kango, N., Jana, U. K. y Choukade, R. (2019). Fungal enzymes: sources and biotechnological applications. En T. Satyanarayana, S. Deshmukh, Deshpande, M. (Eds.). *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*.

- Kenneth, O., Nwadike, E., Kalu, A. y Unah, U. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A novel agent for sustainable food production. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 14 (1), 35-54.
- Khan, S. A., Hamayun, M., Kim, H., Yoon, H., Seo, J.C., Choo, Y., Lee, I., Kim, S., Rhee, I. y Kim, J. (2009). A new strain of *Arthrinium phaeospermum* isolated from *Carex kobomugi* Ohwi is capable of gibberellin production. *Biotechnology Letters*. 31, 283-287.
- Khruengsai, S., Sripahco, T. y Pripdeevech, P. (2022). Microbial degradation of low-density polyethylene by *Neopestalotiopsis phangngaensis*. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 68(6), 287-294.
- Korsa, G., Konwarh, R., Masi, C., Ayele, A. y Haile, S. (2023). Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. *Annals of Microbiology*. 73, 13.
- Kucey, R. M. N. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 63(4), 671-678.
- Lahrmann, U., Ding, Y., Banhara, A., Rath, M., Hajirezaei, M. R., Döhlemann, S., von Wirén, N., Parniske, M. y Zuccaro, A. (2013). Host related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(34), 13965-13970.
- Li, Q., Wu, Q., Zhang, T., Xiang, P., Bao, Z., Tu, W., Li, L. y Wang, Q. (2022). Phosphate mining activities affect crop rhizosphere fungal diversity. *Science of the Total Environment*. 847, 157542.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148, 350-382.
- Loi, M., Glazunova, O., Fedorova, T., Logrieco, A. F. y Mulè, G. (2021). Fungal laccases: the forefront of enzymes for sustainability. *Journal of Fungi*. 7(12), 1048.
- Lueangjaroenkit, P., Teerapatsakul, C., Sakka, K., Sakka, M., Kimura, T., Kunitake E. y Chitradon, L. (2019) Two manganese peroxidases and a laccase of *Trametes*

- polyzona* KU-RNW027 with novel properties for dye and pharmaceutical product degradation in redox mediator-free system. *Mycobiology*. 47(2) 217-229.
- Magalhães, P. O., Ferraz, A. y Milagres, A. F. M. (2006). Enzymatic properties of two  $\beta$ -glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 101, 480-486.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L.D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. y Hyde, K. D. (2011). *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal diversity*. 50, 167-187.
- Massonnet, M., Figueroa, R., Galarneau E. R. A., Miki S., Lawrence. D. P., Sun Q., Wallis. C. M., Baumgartner, K. y Cantu D. (2017) *Neofusicoccum parvum* colonization of the grapevine woody stem triggers asynchronous host responses at the site of infection and in the leaves. *Frontiers in Plant Sciences*. 8,1117.
- Mate, D. M. y Alcalde, M. (2016). Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*. 10, 1457-1467.
- McGuire, K. L. y Treseder, K. K. (2010). Microbial communities and their relevance for ecosystem models: Decomposition as a case study. *Soil Biology & Biochemistry*. 42, 529-535.
- Meyer, V., Basenko, E. Y., Benz, J. P., Braus, G., Caddick, M., Csukai, M., Vries, R., Endy, D., Frisvad, J., Gunde, N., et al. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biol Biotechnol*. 7 (5).
- Mixquititla-Casbis, G. y Villegas-Torres, Ó. G., (2016). Importancia de los fosfatos y fosfitos en la nutrición de cultivos. *Acta Agrícola y Pecuaria*. 2(3), 55-61.
- Mondal, S., Halder, S. K. & Mondal, K. C. (2022). Tailoring in fungi for next generation cellulase production with special reference to CRISPR/CAS system. *Systems, Microbiology and Biomanufacturing*. 2, 113-129.
- Murali, M., Naziya, B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., AlYahya, S., Almatroudi, A., Thriveni, M. C., Gowtham, H. G., Singh, S. B., Aiyaz, M., Kalegowda, N., Lakshmidevi, N.,

- y Amruthesh, K. N. (2021). Bioprospecting of rhizosphere-resident fungi: their role and importance in sustainable agriculture. *Journal of Fungi*. 7(4), 314.
- Muslim, A., Horinouchi, H. y Hyakumachi, M. (2003). Biological control of *Fusarium* wilt of tomato with hypovirulent binucleate *Rhizoctonia* in greenhouse conditions. *Mycoscience*. 44(1), 77-84.
- Naranjo-Briceño, L., Pernía, B., Guerra, M., Demey, J. R., de Sisto, A., Inojosa, Y., González, M., Fusella, E., Freites, M. y Yergues, F. (2013). Potential role of oxidatives exoenzymes of the extremophilic fungus *Pestalotiopsis palmarum* BM-04 in biotransformation of extra-heavy crude oil. *Microbial biotechnology*. 6(6), 720-730.
- Nieto, M. F., Steyaert J. M., Salazar, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., de Souza, J. T., Jimenez, J. F., Ohkura, M., Stewart, A. y Mendoza, A. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Sciences*. 8, 102.
- Páez, L. M. (2012). *Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasa de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil* [Tesis de licenciatura, Escuela Politécnica del Ejercito].
- Palacios-López, L. A. (2023). El uso de biofertilizantes en la agricultura moderna, sus avances, desafíos y perspectivas. *Multidisciplinary Collaborative Journal*. 1(2), 52-64.
- Panchal, K., Gera, R., Garg, R. y Kumar, R. (2024). Laccase enzyme: a sustainable catalyst for bioremediation strategies. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 21(4).
- Parshetti, G.K., Parshetti, S., Kalyani, D.C., Doong, R. y Govindwar, S. P. (2012). Industrial dye decolorizing lignin peroxidase from *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Ann Microbiol*. 62, 217–223.

- Patel, A., Patel, V., Patel, R., Trivedi, U., y Patel, K. (2020). Fungal laccases: versatile green catalyst for bioremediation of organopollutants. En M. Shah, S. Rodríguez, S. Sevinç (Eds). *Emerging Technologies in Environmental Bioremediation*.
- Patel, R., Mehta, K., Prajapati, J., Shukla, A., Parmar, P., Goswami, D., y Saraf, M. (2022). An anecdote of mechanics for *Fusarium* biocontrol by plant growth promoting microbes. *Biological Control*. 174, 105012.
- Pelagio, R., Esparza, S., Garnica, A., López, J. y Herrera, A. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in Plant Science*. 8, 822.
- Peraza, K., De la Rosa, S., Huijara, J. J., Reyes, M. y Gómez, S. (2021). Enzymatic bioprospecting of fungi isolated from a tropical rainforest in Mexico. *Journal of Fungi*. 8(1), 22.
- Podieiablonkaia, E. V., Kolomytseva, M. P., Myasoedova, N. M., Baskunov, B. P., Chernykh, A. M., Classen, T., Pietruszka, J. y Golovleva, L. A. (2017). *Myrothecium verrucaria* F-3851, a producer of laccases transforming phenolic compounds at neutral and alkaline conditions. *Microbiology* 86 (3), 370–376.
- Ranganathan, S., Mahesh, S., Suresh, S., Nagarajan, A., Z. Sen, T., y M.Yennamalli, R. (2022). Experimental and computational studies of cellulases as bioethanol enzymes. *Bioengineered* 13(5), 14028-14046.
- Rao, M. N. A. y Mithal, B. M. (1983). Productions of cellulase from *Pestalotiopsis versicolor*. *Biotechnology and Bioengineering*. 25, 2395-2398.
- Rao, R., Rao, J., y Zhao, M. (2023). Chemical diversity and biological activities of specialized metabolites of the genus *Chaetomium*: 2013-2022. *Phytochemistry*. 210, 113653.
- Răut, I., Calin, M., Capră, L., Gurban, A. M., Doni, M., Radu, N. y Jecu, L. *Cladosporium* sp. isolate as fungal plant growth promoting agent. *Agronomy*. 11, 392.
- Restrepo-Leal, J. D., Belair, M., Fischer, J., Richet, N., Fontaine, F., Rémond, C., Fernandez, O. y Besaury, L. (2023). Differential carbohydrate-active enzymes and

- secondary metabolite production by the grapevine trunk pathogen *Neofusicoccum parvum* Bt-67 grown on host and non-host biomass. *Mycologia*. 115(5), 579–601.
- Reyes, A., García, R., Zetina, R., Espinosa, M., Reveles, M., Aguado, G. A., Camas, R., Pérez, A. y Patishtan, J. (Eds.) (2023). *Producción y uso de bioinsumos para la nutrición vegetal y conservación de la fertilidad del suelo*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Rodríguez, I., Solano, S., Cortés, J. y Rojas, K. (2025). Deepsea fungi of the eastern tropical Pacific of Costa Rica: morphological, genetic, and enzymatic characterization. *Frontiers in Marine Science*. 12, 1514874.
- Rodríguez, M. M., Alemán, G. S., Rodríguez, J. M., Dieck, G., Martínez, S. O., Barceló, D. y Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 74, 21-45.
- Romero, A. J., Arias, R. M. y Mendoza, R. (2019). Aislamiento y selección de hongos de suelo solubilizadores de fósforo nativos del estado de Coahuila, México. *Acta Botánica Mexicana*. 126, e:1390.
- Rubilar, O. (2007). *Biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol (PCF) por hongos de pudrición blanca* [Tesis doctoral, Universidad de la Frontera].
- Salvatore, M. M., Andolfi, A. y Nicoletti, R. (2021). The genus *Cladosporium*: A rich source of diverse and bioactive natural compounds. *Molecules*. 26, 3959.
- Sánchez, R. E., Sánchez, B. L., Sandoval, Y. K. M., Ulloa, A., Armendáriz, B., García, M. C. y Marcías, M. L. (2013). Hongos endófitos: Fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 16(2), 132-146.
- Sazci, A., Radford, A. y Erenler, K. (1986). Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology*. 61, 559-562.



- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. y Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*. 2, 587.
- Singh, A., Bajar, S., Devi, A. y Pant, D. (2021). An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*. 14, 100652.
- Singh, C. P., Mishra, M. M. y Yadav, K. S. (1980). Solubilization of insoluble phosphates by thermophilic fungi. *Annales de microbiologie*. 131B (3), 289-286.
- Singh, D. y Gupta, N. (2020). Microbial laccase: a robust enzyme and its industrial applications. *Biologia*. 75, 1183-1193.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. y Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *Biotech*. 6, 174.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P., Gupta, V. K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., Manikanta, A. y Ramteke, P. (2018). Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 82, 2379-2386.
- Sundara, W. y Sinha, M. K. (1963). Phosphate dissolving organisms in the soil and rhizosphere. *Indian Journal of Science*. 33, 272-278.
- Tarafdar, J. C. y Gharu, A. (2006). Mobilization of organic and poorly soluble phosphates by *Chaetomium globosum*. *Applied Soil Ecology*, 32, 273-283.
- Thrimothi, D., Sujatha, E., Swetha, K. G. y Krishna, G. (2023). Isolation, screening, identification, and assessment of laccase-producing fungi isolated from different environmental samples. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 20(4), 1303-1315.
- Tian, W., Su, P., Chen, Y. y Maharachchikumbura, S. S. N. (2023). Four new species of *Torula* (Torulaceae, Pleosporales) from Sichuan, China. *Journal of Fungi*. 9, 150.

- Tinoco, H. A., López, J., Ortiz, R., López, J., Reyes, H., Campos, J. y López, J. S. Sucrose supplements modulate the *Pseudomonas chlororaphis*-*Arabidopsis thaliana* interaction via decreasing the production of phenazines and enhancing the root auxin response. *Journal of Plant Physiology*, 297, 154259.
- Tralamazza, S. M., Piacentini, K. C., Iwase, C. H. T. y de Oliveira, L. (2018). Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Current Opinion on Food Science*. 23, 57-63.
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, Ewa y Jaroszek, J. (2025). *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*. 23 (4), 2329.
- Uzma, F., Konappa, N. M., & Chowdappa, S. (2016). Diversity and extracellular enzyme activities of fungal endophytes isolated from medicinal plants of Western Ghats, Karnataka. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 3, 335–342.
- Vacheron, J., Moëgne, Y., Dubost, A., Gonçalves, M., Muller, D. y Prigent, C. (2016). Fluorescent *Pseudomonas* strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Frontiers in Plant Science*. 7, 1212.
- Vassileva, M., Mendes, G., Deriu, M. A., Benedetto, G. d., Flor-Peregrin, E., Mocali, S., Martos, V., y Vassilev, N. (2022). Fungi, P-solubilization, and plant nutrition. *Microorganisms*. 10(9), 1716.
- Walker, G. (2025). *Dr. Guy's Passport to Kingdom Fungi*. Ten Speed Press.
- Watkinson, S. C., Boddy, L. y Money, N. P. (2016). *The Fungi* (3ra ed.). Elsevier Ltd.
- Wrzosek, M., Ruszkiewicz-Michalska, M., Sikora, K., Damszel, M. y Sierota, Z. (2016). The plasticity of fungal interactions. *Mycol Progress*. 16(1), 101-108.
- Wu, C., Wang, Y. y Yang, Y. (2022). *Pestalotiopsis* diversity: Species, dispositions, secondary metabolites, and bioactivities. *Molecules* 27, 8088.

- Xu, H., Guo, MY., Gao, YH., Bai, XH. y Zhou, XW. (2017). Expression and characteristics of manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* in *Pichia pastoris* and its application in the degradation of four dyes and phenol. *BCM Biotechnology*. 17, 19.
- Yoon, J. H., Hong, S. B., Ko, S. J. y Kim, S. H. (2007). Detection of extracellular enzyme activity in *Penicillium* using chromogenic media. *Mycobiology*. 35(3), 166-169.
- Zainith, S., Chowdhary, P., Mani, S., y Mishra, S. (2020). *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*.
- Zou, X., Binkley, D. y Doxtader, K. G. (1992). A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant and soil*. 147(2), 243–250.

## Listado de figuras

Nombre y número de figura	Página
Figura 1. Metodología. Bloques de experimentación.	17
Figura 2A. Realización de detección de celulasas con Rojo Congo	20
Figura 2B. Visualización de pruebas cualitativas para actividad enzimática lacasa (cajas azules), lignina peroxidasa (cajas violetas) y manganeso peroxidasa (cajas amarillas)	20
Figura 3A. Inoculación de cepas en tubos Falcón	22
Figura 3B. Tubos colocados en incubadora con agitación orbital	22
Figura 3C. Proceso de filtrado del extracto fúngico	22
Figura 3D. Espectrofotómetro durante medición de absorción	22
Figura 4A y 4B. Proceso de filtración de muestra	24
Figura 4C. Muestras después de haberse añadido el reactivo combinado	24
Figura 5. Colonias en medio de cultivo y microscopía de las cepas seleccionadas	26
Figura 6. Inoculación hongo-planta en Medio MS cepa H105-planta y cepa SPC1-planta	27
Figura 7A. Obtención del peso fresco de la biomasa	27
Figura 7B. Toma de imágenes del follaje	27
Figura 7C. Toma de fotografías de las raíces laterales	27
Figura 8A. Material vegetal sumergido en acetona al 80%	28
Figura 8B. Extractos	28
Figura 8C. Lecturas de muestras en microplacas	28
Figura 9. Proporción de especies con y sin actividad en las diferentes enzimas probadas	32
Figura 10. Análisis cualitativos con medios reveladores sólidos para detección de actividad enzimática y solubilización de fósforo	38
Figura 11A. Dinámica de solubilización de fósforo (SF) en medio líquido durante 25 días	44
Figura 11B. Prueba Tukey de la actividad SF durante 25 días	45
Figura 11C. Dinámica del pH en los medios líquidos durante la incubación en 25 días	45
Figura 12A. Largo de la raíz primaria	47
Figura 12B. Número de raíces laterales	48
Figura 12C. Densidad de raíces laterales	48
Figura 13A. Peso fresco radicular	52
Figura 13B. Peso fresco foliar	52
Figura 13C. Clorofila	53
Figura 14. Interacción hongo-planta a 5 días de su inoculación	54

### Listado de tablas

Nombre y número de tabla	Página
Tabla 1. Cepas utilizadas para las diferentes pruebas	18
Tabla 2. Evaluación cualitativa de actividad enzimática (C. celulosa, L. lacasa, LP. lignina peroxidasa, MP. manganeso peroxidasa) y solubilizadora de fósforo (SF) de las cepas estudiadas	31
Tabla 3. Imágenes de follaje, raíz primaria y raíces laterales de <i>Arabidopsis thaliana</i> transcurridos 5 días de la inoculación hongo-planta	51
Tabla 4. Imágenes de follaje, raíz primaria y raíces laterales de <i>Arabidopsis thaliana</i> mostrando respuestas auxínicas	55

## ANEXOS

### Anexo 1. Elaboración del medio revelador de actividad enzimática de celulasa

Reactivos	Procedimiento
1. Extracto de levadura 2. Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) 3. Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ) 4. Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) 5. Sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4$ ) 6. Fosfato de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 7. Carboximetilcelulosa 8. Agar bacteriológico	Para elaborar un litro se empleó: 2 g de extracto de levadura, 2 g de nitrato de sodio, 0.5 g de cloruro de potasio, 0.5 g de sulfato de magnesio, 0.5 g de sulfato de hierro, 0.01 g de fosfato de potasio, 10 g de carboximetil y 20 g de agar microbiológico. Después de haber pesado todos los reactivos, se hidratan con agua destilada y la mezcla se colocó sobre una parrilla con calor y agitación constante. Se recomienda mantener el medio en agitación continua, ya que la carboximetilcelulosa tarda en disolverse y homogeneizarse. Finalmente, el medio se esterilizó a $121^\circ\text{C}$ durante 20 a 25 minutos.

### Anexo 2. Elaboración del medio revelador de actividad enzimática de lacasa, lignina y manganeso peroxidasa

Reactivos	Procedimiento
1. Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) 2. Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 3. Agar bacteriológico 4. Tartrato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) 5. Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 6. Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 7. Colorante: ABTS (lacasa), Azure B (lignina peroxidasa) y	En primer lugar, se pesaron los siguientes reactivos: 10 g/L de glucosa, 2 g/L de fosfato monopotásico, 22 g/L de agar bacteriológico, 0.2 g/L de tartrato de amonio, 0.1 g/L de cloruro de calcio y 0.5 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado. Los reactivos se hidrataron con agua destilada estéril y la mezcla se colocó sobre una parrilla con calor y agitación constante. Se recomienda mantener el medio en agitación continua hasta lograr su completa homogeneización, se ajustó el pH a 5.5.  De forma paralela, se pesaron 0.2 g/L de colorante, el cual se envolvió en papel aluminio con doble capa. Tanto la solución de los reactivos como el colorante se esterilizaron a $121^\circ\text{C}$ durante 20 a 25 minutos. En un ambiente aséptico, el medio de cultivo se agitó manualmente con movimientos orbitales, se añadió el colorante y se continuó agitando hasta su completa disolución. Finalmente, el medio se vertió en cajas de Petri.

Rojo Fenol (manganeso peroxidasa).	
--	--

### Anexo 3

#### Elaboración del buffer de acetato de sodio

Reactivos	Procedimiento
1. Ácido acético glacial 0.1 M (CH <sub>3</sub> -COOH) 2. Acetato de sodio 0.1 M (CH <sub>3</sub> COONa)	Se midieron 1.5013 mL de ácido acético glacial, mismos que fueron aforados a 250 mL de agua destilada para tener la concentración de 0.1 M. Posteriormente, se pesaron 2.0508 g de acetato de sodio, los cuales fueron integrados a 250 mL de agua destilada. Para finalizar, ambas soluciones se añadieron y agitaron hasta homogeneizarse, después se ajustó su pH a 4.5 y se almacenó a 4°.

### Anexo 4

#### Elaboración del medio de Sundara

Reactivos	Procedimiento
3. Cloruro de potasio (KCl) 4. Sulfato de amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 5. Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> ) 6. Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> ) 7. Cloruro de sodio (NaCl) 8. Glucosa 9. Extracto de levadura 10. Agar bacteriológico 11. Sulfato de fierro (FeSO <sub>4</sub> ) 12. Goma arábica 13. Fosfato tricálcico (Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	Para la elaboración de este medio se pesaron los siguientes reactivos: 0.2 g/L cloruro de potasio, 0.5 g/L de sulfato de amonio, 0.3 g/L de sulfato de magnesio, 0.004 g/L de sulfato de manganeso, 0.2 g/L de cloruro de sodio, 10 g/L de glucosa, 0.5 g/L de extracto de levadura, 18 g/L de agar bacteriológico, 0.002 g de sulfato de fierro y 0.5 g/L de goma arábica. De forma paralela, se pesaron 0.5 g/L de fosfato tricálcico, el cual se envolvió en papel aluminio con doble capa. Tanto la solución de los reactivos como el fosfato tricálcico se esterilizaron a 121 °C durante 20 a 25 minutos. En un ambiente aséptico, el medio de cultivo se agitó manualmente con movimientos orbitales, se añadió el fosfato tricálcico y se continuó agitando hasta su completa disolución. Finalmente, el medio se vertió en cajas de Petri.

## Anexo 5

### Elaboración del reactivo combinado

Reactivos	Procedimiento
1. Ácido sulfúrico 5N ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 2. Tartrato de antimonio ( $(\text{NH}_4)_3\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) 3. Molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ ) 4. Ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ )	Para la elaboración de 300 ml del reactivo combinado se deben agregar los reactivos en el siguiente orden, de lo contrario no se llevará a cabo la reacción deseada: 150 ml de ácido sulfúrico, 15 mL de tartrato de antimonio, 45 mL de molibdato de amonio y 1.584 g de ácido ascórbico que previamente fue disuelto en agua destilada.

### Metodología de preparación de los reactivos

Ácido sulfúrico	En 600 ml de agua destilada se agregan 140 ml de $\text{H}_2\text{SO}_4$ y se afora a 1L.
Tartrato de antimonio	Se disuelven 3 g de $(\text{NH}_4)_3\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ en 50 mL de agua destilada, posteriormente se aforan a 100 ml.
Molibdato de amonio	Disolver 4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ en 100 ml de agua destilada.
Ácido ascórbico	Se disuelve la cantidad a utilizar en agua destilada hasta que se homogenice (este reactivo se prepara al momento de utilizarse).

## Anexo 6

### Elaboración del medio Murashige y Skoog (MS)

Reactivos	Procedimiento
Sacarosa Agar bacteriológico Medio MS	Para elaborar un litro de este medio se utilizó: 6 g/L de sacarosa y 0.9 g/L de Medio MS. Se hidrataron los reactivos anteriores con 1L de agua destilada y se colocó sobre una parrilla con calor y agitación constante. Cuando la mezcla este homogénea, se ajustó el pH a 7, posteriormente se agregó 10 g/L de agar y se mantuvo en agitación. Finalmente, el medio se esterilizó a $121^\circ\text{C}$ durante 20 a 25 minutos.



## Anexo 7

### Elaboración de la solución 1 (HCl 0.24 N en metanol 20%)

Reactivos	Procedimiento
Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) Ácido clorhídrico (HCl)	Para elaborar 125 ml se mezcla: 25 ml de metanol, 2.5 ml de ácido clorhídrico y 97.5 ml de agua destilada.

### Elaboración de la solución 2 (NaOH 7% en etanol 60%)

Reactivos	Procedimiento
Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) Hidróxido de sodio (NaOH)	Para elaborar 100 ml se mezcla: 60 ml de metanol, 7 ml de hidróxido de sodio y 33 ml de agua destilada.