



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Máster en Ingeniería Agronómica**

*Mejora de la producción del cultivo de tomate  
mediante la aplicación de metabolitos  
secundarios producidos por hongos endófitos*

*Alumno: Álvaro Iglesias Ganado*

*Tutor: Jorge Martín García  
Cotutor: Jorge Poveda Arias*

*Febrero de 2025*

---

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. Situación agrícola actual .....	4
2.2. El tomate .....	4
2.2.2. Situación del tomate .....	6
2.2.3. Problemática actual en el tomate.....	6
2.2.4. Posibles estrategias agrícolas ante la situación planteada.....	7
2.3. Hongos endófitos .....	8
2.4. Extracción de metabolitos secundarios de hongos endófitos.....	9
2.4.1. Pulverización foliar de metabolitos secundarios .....	9
2.4.2. Tratamiento de semillas con metabolitos secundarios de hongos endófitos ( <i>mycopriming</i> ) .....	10
3. OBJETIVOS .....	13
4. MATERIALES Y MÉTODO .....	15
4.1. Material fúngico y vegetal utilizado .....	15
4.2. Medios de cultivo.....	15
4.3. Preparación cultivos fúngicos .....	15
4.4. Extracción de metabolitos.....	16
4.5. Aplicación en semilla.....	18
4.6. Ensayo de germinación y crecimiento en placa Petri .....	19
4.7. Ensayo de crecimiento en bandejas de alveolos .....	20
4.8. Metabolitos secundarios de <i>T. ruber</i> como estrategia para mitigar el estrés salino en tomate .....	21
4.8.1. Localización, puesta en marcha y mantenimiento .....	21
4.8.2. Tratamientos foliares con metabolitos.....	24
4.8.3. Tratamientos salinos.....	24
4.8.4. Mediciones realizadas .....	24
4.9. Análisis estadístico.....	25

---

5. RESULTADOS .....	27
5.1. Análisis germinación en placa Petri .....	27
5.2. Análisis de crecimiento en placa Petri .....	29
5.3. Análisis de crecimiento en bandeja de alveolos.....	31
5.4. Metabolitos secundarios de <i>T. ruber</i> como estrategia para mitigar el estrés salino en tomate .....	35
5.4.1. Medición inicial (antes de los tratamientos) .....	35
5.4.2 Segunda medición (30 días después del primer tratamiento).....	35
5.4.3 Tercera medición (30 días después del segundo tratamiento).....	38
5.4.4 Medición de producción y biomasa aérea .....	40
6. DISCUSIÓN.....	45
6.1. Ensayo en placa Petri.....	45
6.2. Ensayo de crecimiento en bandeja de alveolos.....	47
6.3. Efecto de los metabolitos secundarios extraídos de <i>T. ruber</i> y la salinidad en la fisiología y producción del tomate.....	48
7. CONCLUSIONES.....	53
8. BIBLIOGRAFÍA.....	55

## **1. RESUMEN**

## 1. RESUMEN

El rápido aumento de la población mundial, la escasa disponibilidad de tierras aptas para el cultivo, el impacto del cambio climático y las nuevas regulaciones que limitan el uso de insumos agrícolas hacen imprescindible la búsqueda de soluciones sostenibles para incrementar la productividad de los cultivos. Esta investigación contribuye al desarrollo de estrategias innovadoras para abordar estos desafíos. Numerosos estudios han demostrado que los hongos endófitos pueden actuar como bioestimulantes en los cultivos, promoviendo el crecimiento vegetal a través de la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, su aplicación en campo presenta limitaciones debido a la variabilidad de las condiciones agrícolas. Una posible alternativa es la fermentación de hongos *in vitro*, seguida de la extracción de sus metabolitos para su posterior aplicación en plantas.

En la primera fase de este estudio, se evaluó la eficacia de la novedosa técnica mycopriming, basada en la aplicación de metabolitos secundarios extraídos sobre la semilla de tomate (*Solanum lycopersicum*). Como cribado inicial, se analizaron los efectos de los extractos obtenidos de *Trichoderma citrinoviride*, *Talaromyces ruber*, *Epicoccum tritici* y *Alternaria tellustris*, utilizando tanto los extractos del medio de cultivo como los procedentes del micelio. La evaluación se llevó a cabo mediante un ensayo de germinación en placa Petri, determinándose que los metabolitos extraídos del micelio de *A. tellustris* y *E. tritici* inhibieron parcialmente la germinación, mientras que el resto de los tratamientos no presentó mejoras significativas respecto al control. Dado que *T. ruber* no afectó negativamente la germinación, esta cepa fue seleccionada para un segundo ensayo en bandeja de alveolos, en el que se evaluaron los metabolitos del micelio y del medio de cultivo. Los resultados de este ensayo fueron prometedores, ya que ambos tratamientos generaron mejoras significativas tanto en el crecimiento como en el peso de la plúmula y de la radícula.

En la segunda fase del estudio, se evaluó el efecto de la aplicación foliar de metabolitos extraídos del filtrado de *T. ruber* en plantas de tomate en estadios avanzados, tanto en condiciones de salinidad como en condiciones normales. Se realizaron mediciones fisiológicas de clorofila, flavonoles y antocianinas, observándose que los metabolitos interfirieron en la concentración de estos compuestos. En este ensayo, se llegó a la cosecha de frutos, determinándose que las plantas tratadas con metabolitos presentaron un mayor diámetro de fruto. Sin embargo, en términos de producción total, la salinidad provocó una reducción

significativa, y los metabolitos no fueron capaces de mitigar este efecto. Por lo tanto, se descarta su eficacia para mitigar el estrés salino en un nivel de salinidad tan alto como el aplicado en este estudio. En futuros ensayos, sería interesante evaluar diferentes concentraciones salinas para determinar su posible influencia en la respuesta de las plantas a estos tratamientos.

## **2. INTRODUCCIÓN**

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Situación agrícola actual

Debido al previsible aumento de la población mundial, para el año 2050 se estima que las necesidades alimentarias aumenten entre un 35% y un 56% (Van Dijk et al., 2021). La superficie agrícola es limitada y casi en su totalidad ya está en producción, por lo que la solución para alimentar a la población futura debe proceder de una intensificación progresiva y sostenible de la agricultura (FAO, 2023).

El cambio climático está generando grandes problemas en la actualidad, como fenómenos meteorológicos extremos y sequías prolongadas, que causan grandes pérdidas económicas y que se prevé que se vuelvan más frecuentes en el futuro (Smirnov et al., 2023). En la región mediterránea, el aumento previsto de las temperaturas podría reducir los rendimientos de las cosechas debido al estrés térmico causado por temperaturas elevadas (Hristov et al., 2020).

En la Unión Europea, el Pacto Verde Europeo, en su estrategia “De la Granja a la Mesa”, establece una reducción del 50% en el uso de fitosanitarios y un 25% en el uso de fertilizantes químicos de síntesis. Al mismo tiempo, promueve que la superficie destinada al cultivo ecológico alcance el 25% de la superficie total, con el objetivo de fomentar prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente (Comisión Europea, 2019). Esto está generando una serie de problemas, debido a la necesidad de encontrar alternativas a las prácticas actuales sin comprometer la producción (Montanarella et al., 2020).

Frente a estos desafíos, es imprescindible buscar soluciones que permitan mantener o incluso incrementar los rendimientos agrícolas en el contexto actual, marcado por cambios legislativos, climáticos y demográficos, especialmente en cultivos clave para la economía local, como el tomate. Este cultivo enfrenta retos y particularidades que requieren atención, así como soluciones innovadoras y sostenibles.

### 2.2. El tomate

#### 2.2.1. Taxonomía y biología.

Para conocer mejor el cultivo del tomate, es esencial conocer su taxonomía y biología. El tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenece a la familia de las solanáceas, cuya taxonomía se detalla en la Tabla 2.1. Es una planta que puede crecer de forma rastrera o erecta. Sus variedades

se clasifican en dos tipos principales: aquellas de crecimiento determinado, que detienen su desarrollo al formar varias inflorescencias laterales y una terminal, y las de crecimiento indeterminado, en las que solo se producen inflorescencias laterales mientras el tallo principal continúa alargándose, pudiendo alcanzar hasta dos metros de altura (Maroto, 2017).

TABLA 2.1. Resumen de la taxonomía del tomate. Fuente: National Center for Biotechnology Information (2024)

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Clase</b>	Angiospermae
<b>Subclase</b>	Dicotyledonae
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Género</b>	<i>Solanum</i>
<b>Especie</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>

El sistema radicular del tomate está compuesto por una raíz principal corta con numerosas raíces secundarias. El tallo es anguloso está cubierto por tricomas que actúan como defensa natural contra plagas y le confieren el olor característico (Capel et al., 2019). Las hojas son alternas, imparipinnadas, con folíolos peciolados, lobulados y de borde dentado. Las flores son hermafroditas, de color amarillo y agrupadas en racimos, que pueden ser simples o ramificados, desarrollándose en las axilas de las hojas, generalmente cada dos o tres hojas. (Maroto, 2017).

El fruto del tomate es una baya que puede ser globosa o piriforme y adquiere un color rojo al madurar. Las semillas son discoidales, de color grisáceo y están recubiertas por una fina vellosidad (Maroto, 2017).



### **2.2.2. Situación del tomate**

Según datos de la FAO, en 2022 el tomate fue la hortaliza más cultivada a nivel mundial, con una superficie de 4,9 millones de hectáreas. La producción global superó los 186 millones de toneladas, alcanzando un rendimiento promedio de 38 toneladas por hectárea. (FAO, 2024)

En la Unión Europea, se cultivaron 208.630 hectáreas, con un rendimiento medio de 74 toneladas por hectárea. En España, según el Anuario de Estadística Agrícola de 2022 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), se destinaron más de 55.000 hectáreas al cultivo de tomate, logrando una producción superior a los 4,5 millones de toneladas, consolidándose como la hortaliza más producida en el país. De esta superficie, aproximadamente el 70 % correspondió a cultivos al aire libre, mientras que el resto se desarrolló en sistemas protegidos (FAO, 2024).

Castilla y León, con 47 hectáreas dedicadas al cultivo de tomate, no es un referente nacional en términos de producción (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2022). Sin embargo, presenta un notable potencial, debido a los retos que enfrentan las principales provincias productoras, como los efectos del cambio climático y los problemas asociados a una excesiva intensificación agrícola, entre ellos el aumento en la incidencia de plagas y enfermedades, así como la contaminación de acuíferos por lixiviación de nitrato (FAO, 2011)

### **2.2.3. Problemática actual en el tomate**

A pesar de su importancia, el cultivo del tomate enfrenta varios problemas que afectan tanto su rendimiento como su calidad. Uno de los principales desafíos es la proliferación de enfermedades causadas por patógenos como hongos, virus, bacterias y nemátodos (Karačić et al., 2024). Estos patógenos reducen los rendimientos y la calidad de los tomates, además, su control se ve dificultado por las restricciones en el uso de productos químicos. Los sistemas intensivos, comunes en regiones como Andalucía y Murcia, agravan esta situación, ya que la falta de rotación de cultivos favorece la acumulación y desarrollo de plagas y enfermedades (Janssen et al., 2018).

Además, el cambio climático está intensificando estos problemas, especialmente con el aumento de las temperaturas en verano, que afecta negativamente el crecimiento y la calidad del tomate (Litskas et al., 2019). Asimismo, la salinidad del suelo y del agua, particularmente en las zonas costeras, se ha convertido en un desafío creciente. La acumulación de sales en el suelo reduce la capacidad de las plantas para absorber agua y nutrientes, lo que disminuye el

rendimiento y aumenta la susceptibilidad a enfermedades (El-Banna y Mosa, 2024). Estos factores, combinados, representan una amenaza constante para la sostenibilidad del cultivo de tomate en España, dificultando el mantenimiento de una producción estable y de alta calidad (Ullah et al., 2021).

#### **2.2.4. Posibles estrategias agrícolas ante la situación planteada**

Analizados los problemas a los que se enfrentan los cultivos en general, y en particular para el caso del tomate en España, cabe realizar un estudio sobre las diferentes soluciones a estos problemas:

**Cambiar el modelo productivo:** el cultivo del tomate se concentra en áreas tradicionalmente más productivas, lo que ha llevado a una intensificación excesiva que ocasiona los problemas mencionados previamente. Una posible solución podría ser reducir la superficie de cultivo en estas zonas y trasladarla a otros territorios en los que históricamente no se cultiva tomate. Esto podría implicar una pérdida de producción a corto plazo, pero sería más sostenible a largo plazo, aliviando la creciente intensificación en las áreas afectadas (FAO, 2013).

**Mejora genética:** la mejora genética ha permitido, históricamente, un aumento en la producción potencial de los cultivos de aproximadamente un 1% anual (Noleppa y Carlsburg, 2021). Con las nuevas tecnologías de edición genética, se prevé que la capacidad productiva pueda incrementarse de manera aún más acelerada. Sin embargo, es relevante señalar que el uso de variedades de tomate modificadas genéticamente está prohibido en la Unión Europea, al igual que en muchos otros cultivos (Fundación Antama, 2015). Además, la mejora genética no solo se enfoca en aumentar la producción, sino que también persigue la creación de variedades más resistentes o tolerantes a diversos tipos de estrés, tanto abióticos como bióticos (Larriba et al., 2024).

**Aplicación de microorganismos:** con el objetivo de reducir los productos de síntesis química, surgen productos a base de microorganismos. Estos bioinoculantes, compuestos por hongos, bacterias o algas, desempeñan roles como la fijación de nitrógeno atmosférico en el suelo, la solubilización de fósforo y potasio, la producción de fitohormonas y compuestos antimicrobianos (dos Reis et al., 2024). Dentro de esta técnica, encontramos la aplicación de hongos endófitos, que han demostrado ser eficaces en la mejora del crecimiento y la resistencia a enfermedades (Muhammad et al., 2024).

### 2.3. Hongos endófitos

Dentro de estos microorganismos beneficiosos se encuentran los hongos endófitos, los cuales residen de forma asintomática en el interior de las plantas, colonizando sus tejidos y estableciendo una relación simbiótica (Poveda et al., 2022). Los beneficios de esta relación pueden dividirse en directos e indirectos. Los beneficios directos incluyen la ayuda en la adquisición de nutrientes y la producción de fitohormonas, mientras que los indirectos abarcan la producción de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas, la activación de mecanismos de resistencia vegetal y la protección frente a estreses abióticos y bióticos (Baron & Rigobelo, 2022).

Se han realizado un gran número de investigaciones sobre el uso de estos hongos con el objetivo de aprovechar sus beneficios en la agricultura. Muchas de estas investigaciones se han llevado a cabo en condiciones de laboratorio o en ambientes controlados. Sin embargo, el desafío surge al intentar reproducir los beneficios obtenidos en condiciones de campo, donde la falta de control sobre las variables ambientales y la presencia de factores impredecibles suelen dar lugar a resultados que no reflejan los obtenidos en entornos controlados (Dwisandi et al., 2024). Este problema puede deberse a diversos factores:

- La heterogeneidad del suelo tiene un impacto significativo en el microbioma, en la disponibilidad de nutrientes y, como resultado, en la capacidad del hongo para generar los beneficios esperados (Adomako et al., 2022).
- Temperatura, pH y humedad pueden influir en la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio, lo que puede impedir la colonización de la planta por parte del hongo (Jackson et al., 1991).

Para paliar estos problemas, es necesario estudiar cómo actúan estos hongos beneficiosos. En muchos casos, estos efectos se deben a la producción de una serie de metabolitos secundarios, los cuales son responsables de las ventajas observadas (James et al., 2022). La aplicación de dichos metabolitos podría ser una alternativa efectiva a la problemática explicada, ya que es posible obtener estos compuestos en laboratorio y aplicarlos posteriormente en campo, sin necesidad de recurrir a la inoculación, que presenta los problemas previamente mencionados (Rodrigo et al., 2022).

## 2.4. Extracción de metabolitos secundarios de hongos endófitos

Los hongos endófitos son reconocidos como una fuente de metabolitos secundarios con propiedades interesantes en diversas industrias, incluida la agrícola (Schulz et al., 2002). La aplicación de estas sustancias bioactivas en las plantas suele generar efectos similares a los derivados de la relación simbiótica entre el hongo endófito y la planta, con la ventaja de evitar los problemas asociados a la inoculación directa (Rodrigo et al., 2022).

La extracción de estos metabolitos puede realizarse de diversas formas, todas ellas con un proceso común: el crecimiento del hongo en medio de cultivo líquido (denominado fermentación) y la posterior separación del micelio mediante filtrado. La diferencia radica en el método de purificación final, que elimina esporas y cualquier resto de micelio. En las distintas investigaciones se pueden identificar tres técnicas principales: filtrado con unidad de vacío con Manifold (Imran et al., 2023), filtrado a través de una membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (M'Henni et al., 2022) y filtrado mediante solventes y evaporación rotativa (García-La Torre et al., 2022), siendo este último el método que permite la extracción de metabolitos del micelio.

Cada cepa fúngica puede producir diferentes moléculas dependiendo de las condiciones en las que se lleve a cabo el proceso de fermentación. Esto es relevante, ya que las condiciones de cultivo pueden influir en la reproducibilidad de los resultados (da Silva et al., 2023).

El estudio de la producción de estos metabolitos despierta un gran interés en la agricultura. No solo por la posibilidad de aplicar las sustancias directamente a las plantas, sino también por el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas que podrían ser sintetizadas químicamente (Rodrigo et al., 2022). La aplicación de metabolitos secundarios puede realizarse de varias maneras dependiendo del objetivo y del tipo de cultivo. Entre las más destacadas destacan la pulverización foliar y la aplicación en semillas (*mycopriming*).

### 2.4.1. Pulverización foliar de metabolitos secundarios

La pulverización foliar puede utilizarse con dos fines principales. Por un lado, se emplea para el control de enfermedades (Ismail et al., 2021). Por otro lado, su uso como bioestimulante, permite promover el crecimiento de las plantas o inducir resistencia frente a distintos tipos de estrés (Rodrigo et al., 2022).

Dentro del control de enfermedades, se han llevado a cabo numerosas investigaciones, tanto *in vitro* como *in planta*. Dentro de los estudios *in vitro*, se utilizaron metabolitos extraídos

de *Trichoderma* y *Aspergillus*, lo que permitió reducir el crecimiento del micelio de *Phytophthora* y *Pythium* en placas Petri con medio de cultivo. Asimismo, se logró controlar enfermedades bacterianas *in vitro*, como la causada por *Pseudomonas syringae*, mediante el uso de metabolitos extraídos de *Alternaria leptinellae*, reduciendo significativamente el crecimiento de las bacterias en el medio de cultivo (García-Latorre et al., 2024).

En cuanto a los ensayos *in planta*, se observó una reducción en la severidad de la enfermedad ocasionada por *Alternaria solani* en tomate, tras la aplicación foliar de extractos provenientes de diversas cepas de *Trichoderma* (Imran et al., 2023). Además, se consiguió controlar enfermedades del suelo, como la provocada por *Phytophthora cinnamomi* en *Lupinus luteus*, mediante la aplicación directa al suelo de metabolitos extraídos de diferentes hongos endófitos (García-Latorre et al., 2022).

Por otro lado, se ha observado un efecto bioestimulante en el crecimiento del arroz mediante el tratamiento de plántulas con metabolitos secundarios extraídos de diversos hongos endófitos, lo que resultó en un aumento en el tamaño de las plantas (Pablo, 2020). Además, se han reportado mejoras en el crecimiento inicial de trigo y cebada mediante la aplicación de metabolitos extraídos de *Aspergillus niger* (Mathur et al., 2022). Asimismo, se ha logrado mejorar la calidad de los frutos en *Phaseolus vulgaris*, incrementando el porcentaje de proteínas y carbohidratos en las semillas (Ismail et al., 2021).

El uso de metabolitos secundarios como bioestimulantes frente al estrés abiótico, como la salinidad, aún no ha sido investigado. No obstante, su efectividad ha sido demostrada mediante la inoculación de hongos endófitos (Verma et al., 2021). En este sentido, se sugiere que los metabolitos secundarios podrían tener un efecto similar, mejorando la tolerancia de las plantas ante situaciones de estrés salino.

#### **2.4.2. Tratamiento de semillas con metabolitos secundarios de hongos endófitos (*mycopriming*)**

Una aplicación potencial de estos metabolitos es su uso directo sobre las semillas mediante la técnica de *mycopriming*. En este procedimiento, las semillas se sumergen durante un tiempo determinado en una solución que contiene metabolitos secundarios extraídos de hongos. Este proceso permite que las semillas absorban los metabolitos, lo que puede inducir efectos beneficiosos sobre la germinación y el crecimiento temprano de la planta (García-Latorre et al., 2024). Una vez tratadas, se procede al secado de las semillas antes de ser

sembradas, lo que garantiza su viabilidad para el proceso de germinación (Sher et al., 2019). Con esta técnica, se pueden obtener efectos bioestimulantes utilizando cantidades reducidas de metabolitos extraídos en comparación con las elevadas cantidades requeridas en los tratamientos foliares (García-Latorre et al., 2024).

Con la técnica *mycopriming* se han obtenido buenos resultados en arroz, mejorando el tamaño de las plántulas (Pablo, 2020), además de en *Lolium multiflorum*, donde se observó un aumento significativo en la biomasa y el crecimiento mediante extractos de varios hongos endófitos (García-Latorre et al., 2023). En cuanto a la germinación, se ha logrado mejorar el porcentaje de germinación en trigo, cebada (Mathur et al., 2022) y soja (Waqas et al., 2012). Sin embargo, algunas investigaciones han encontrado que los metabolitos de ciertos hongos endófitos no solo no mejoran, sino que inhiben la germinación de maíz y trigo (Jalander y Gachande, 2012).

### **3. OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es analizar la eficacia del uso de metabolitos secundarios extraídos de hongos endófitos, como promotores de crecimiento y como inductores de tolerancia al estrés por salinidad en plantas de tomate.

El objetivo general podemos desglosarlo en los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto bioestimulante del tratamiento *mycopriming* con metabolitos secundarios extraídos de hongos endófitos sobre la capacidad de germinación, el crecimiento y el metabolismo en plántulas de tomate durante sus primeros estadios de desarrollo
2. Analizar el efecto de los tratamientos foliares con metabolitos secundarios extraídos de *T. ruber* como inductores de resistencia a estrés, evaluando su impacto en el crecimiento, desarrollo y adaptación fisiológica de las plantas de tomate bajo condiciones de salinidad durante todo su ciclo productivo.



## **4. MATERIALES Y MÉTODO**

## 4. MATERIALES Y MÉTODO

### 4.1. Material fúngico y vegetal utilizado

Los hongos endófitos utilizados fueron previamente aislados de diferentes cultivos por el GIR AGROBIOTECH de la Universidad de Valladolid. Se seleccionaron 4 cepas diferentes dentro de la colección:

- *Trichoderma citrinoviride*
- *Talaromyces ruber*
- *Epicoccum tritici*
- *Alternaria tellustris*

En cuanto al material vegetal, se utilizaron semillas comerciales de *Solanum lycopersicum* (tomate) variedad Optima, suministrada por SEMINIS-BAYER. Éstas no recibieron ningún tipo de tratamiento, ni encapsulamiento.

### 4.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron Potato Dextrose Agar (PDA) y Potato Dextrose Broth (PDB), ambos suministrados por Scharlab (Barcelona, España). Para el PDA, se mezclaron 39 g en 1 litro de agua destilada, se esterilizó y posteriormente se dispensó en placas Petri de 90 mm dentro de una cabina de flujo laminar hasta la solidificación de este. El medio PDB se preparó disolviendo 6 g en 250 ml de agua destilada en matraces Erlenmeyer de 500 ml. La mezcla fue esterilizada en autoclave antes de su uso

### 4.3. Preparación cultivos fúngicos

Para la preparación de los cultivos fúngicos y su posterior incubación, se utilizó el método propuesto por García-La Torre (2024). Para cada hongo endófito, se extrajo un fragmento de agar (5 x 5 mm) de las placas de la colección y se colocó en la parte central de una placa Petri de 90 mm con medio PDA. Posteriormente, las placas se incubaron en oscuridad durante 7 días a 25°C. Se extrajeron 4 fragmentos de 5 x 5 mm de cada cepa y se introdujeron en matraces Erlenmeyer con medio PDB previamente esterilizado. Además, se preparó un matraz con solo PDB que fue procesado en la extracción como el resto de cepas para servir como control. Una vez sellados con Parafilm, los 7 Erlenmeyer se pusieron a incubar en un

agitador orbital modelo KS-15 (Edmund Buhler GmbH) a 140 rpm y una temperatura entre 20 y 25 °C.

#### 4.4. Extracción de metabolitos

Para la extracción de los metabolitos, se siguió el método propuesto por García-La Torre (2024). Con el fin de realizar la extracción en el momento óptimo, cada dos días se midió la concentración de glucosa en cada matraz mediante tiras semi-cuantitativas de determinación rápida con rango 50-2000 mg/L, modelo Quantofix (Macherey-Nagel). Cuando la glucosa estaba casi consumida (<100 mg/L), se procedió a la extracción de los metabolitos, la cual se esquematiza en la figura 4.1.

Primero, el cultivo fúngico se filtró por gravedad, utilizando papel de filtro plegado, de porosidad 10-12  $\mu\text{m}$  (Prat Dumas Media), estéril, para separar el micelio del filtrado líquido. En este punto, el proceso se dividió en dos partes (Figura 4.1): por un lado, se procesó el filtrado líquido y, por otro, el micelio retenido en el filtro. En el caso del matraz con PDB no inoculado, al no contener micelio, solo se realizó el filtrado. Éste se utilizó como control.

El filtrado se mezcló con un volumen igual de acetato de etilo en un embudo de decantación de 1 litro (Figura 4.1) y se agitó enérgicamente durante 2 minutos para permitir la separación de los metabolitos del medio acuoso. Posteriormente, se dejó reposar el embudo 2 minutos en un soporte universal de laboratorio hasta que se diferenciaron claramente las dos fases: la fase acuosa en la parte inferior y el acetato de etilo en la superior. Para separarlas, se utilizó la llave de paso del embudo y se eliminó la fase acuosa. Luego, para eliminar posibles residuos de agua, se añadió una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro, que actuó como desecante. La mezcla se agitó durante unos minutos y luego se filtró nuevamente utilizando el mismo tipo de filtro plegado empleado anteriormente.

El líquido resultante se transfirió al matraz del evaporador rotativo (BUCHI Rotavapor R-80), configurado a 800 mbar, 40 °C y 140 rpm. Se dejó el tiempo necesario hasta la completa evaporación del disolvente. El residuo sólido en el matraz (metabolitos secundarios) se resuspendió en 2 ml de metanol mediante la adición con una pipeta. La solución resultante se extrajo del matraz con una pipeta Pasteur de 230 mm y se filtró mediante otra pipeta Pasteur de 145 mm, previamente cargada con algodón en su interior. Este proceso se repitió una vez más y el volumen total obtenido se transfirió a un vial de 10 ml.

Para el procesamiento del micelio separado, se utilizó el método descrito por Halecker (2014). El micelio se introdujo en un vaso de precipitados, se cubrió con acetona al 99,6 % y se agitó en un agitador magnético durante 10 minutos. Posteriormente, el vaso de precipitados se sumergió en un sonicador a 40 °C y 35 Khz durante 10 minutos. Después, el contenido se filtró nuevamente con el mismo tipo de filtro plegado utilizado previamente. El líquido resultante se transfirió al evaporador rotativo, programado a 600 mbar, 40 °C y 140 rpm, para eliminar la acetona. A continuación, se mezcló con un volumen igual de acetato de etilo en un embudo de decantación, se agitó manualmente durante 1 minuto y se dejó reposar para separar las fases. La fase acuosa se eliminó utilizando la llave de paso del embudo.

Se eliminó el agua residual añadiendo sulfato de sodio anhidro y agitando la solución en un agitador magnético. Finalmente, la mezcla se filtró nuevamente con el mismo tipo de filtro y el líquido resultante se introdujo en el evaporador rotativo bajo los mismos parámetros que los usados para el filtrado. Los metabolitos extraídos del matraz rotatorio se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento descrito para el filtrado.

Una vez preparados los viales, se eliminó el metanol para conservar los metabolitos. Los viales se colocaron en un evaporador de viales (DNA 120 SPEED VAC) y se dejaron el tiempo necesario hasta eliminar completamente el metanol. Con este proceso finalizado, los metabolitos quedaron listos para su almacenamiento a 4°C.

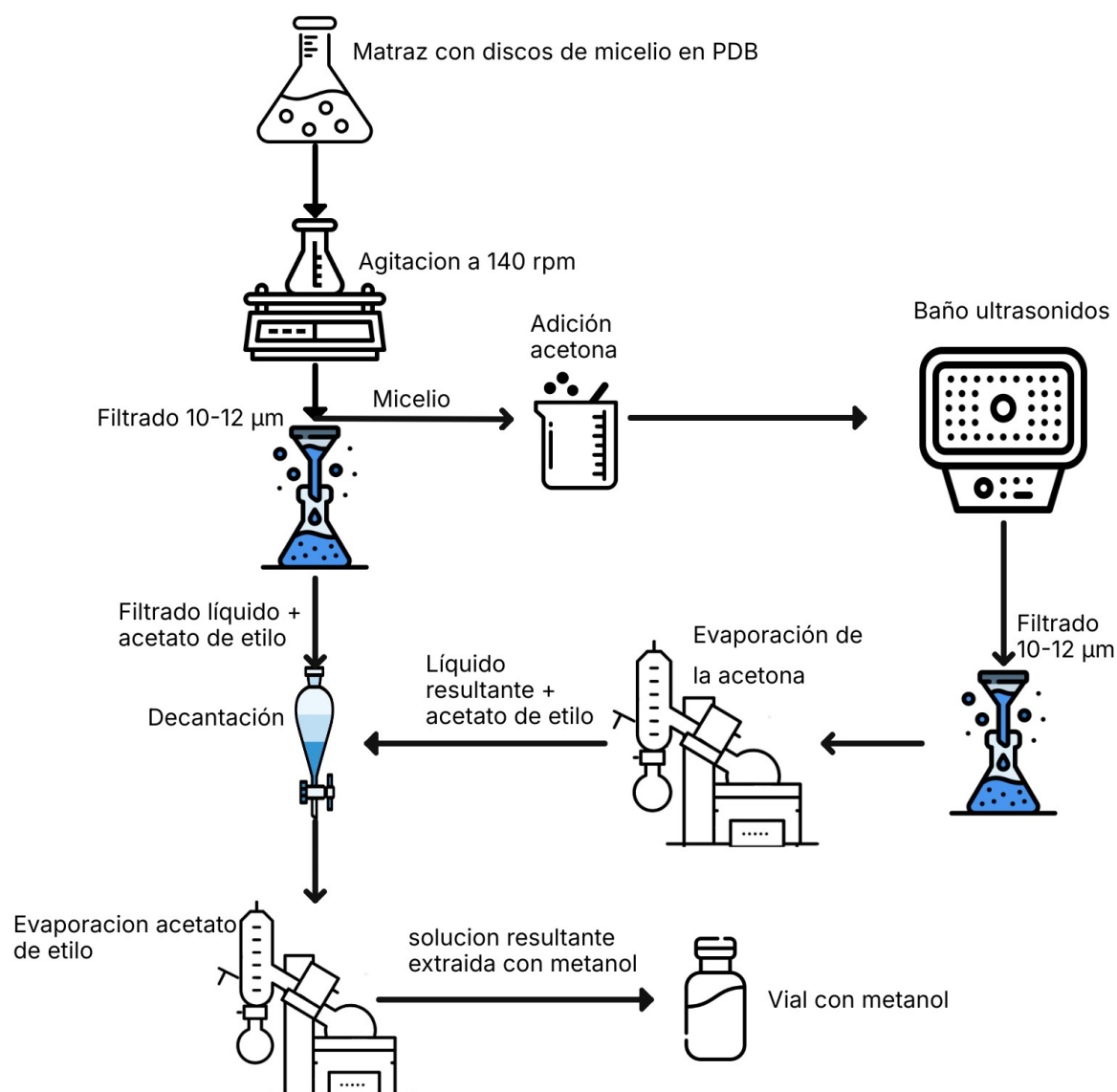


FIGURA 4.1. Proceso completo de extracción de metabolitos secundarios de hongos endófitos mediante solventes y evaporador rotativo. Fuente: elaboración propia.

#### 4.5. Aplicación en semilla

Los metabolitos en los viales fueron resuspendidos añadiendo 1 ml de una solución de agua destilada con dimetilsulfóxido (DMSO) al 2,5 %. La mezcla se agitó en un vórtex y, posteriormente, se transfirió a la solución. Este proceso se repitió dos veces para asegurar la completa recuperación de los metabolitos del vial. La misma metodología se aplicó tanto para los filtrados como para los micelios.

Para la aplicación en semilla, estas se sumergieron en un vaso de precipitados con agua destilada, al que se añadió la solución de metabolitos y DMSO al 2,5 %, obteniendo una

concentración final de 1 mg/ml. Las semillas permanecieron en inmersión durante 12 horas en un agitador orbital modelo KS-15 (Edmund Bühler GmbH). Transcurrido este tiempo, se retiraron y se dejaron secar sobre papel de filtro durante 24 horas.

#### 4.6. Ensayo de germinación y crecimiento en placa Petri

Con el fin de realizar un primer cribado y seleccionar las cepas con mejores resultados, se llevó a cabo un ensayo de germinación en placas Petri de 90 mm. En ellas se colocó un papel de filtro estéril de 60 g/m<sup>2</sup>, sobre éste se colocaron 5 semillas de tomate, que fueron cubiertas con una segunda capa de papel. Posteriormente se añadieron 5 ml de agua destilada estéril con pipeta y las semillas fueron selladas con Parafilm para evitar la evaporación del agua.

Se preparó un total de 4 placas por tratamiento, incluido el control, como se detalla en la Tabla 4.1. Para cada cepa se utilizó tanto el filtrado como el micelio. Para el control se utilizó el resultante del matraz con PDB sin inoculación.

TABLA 4.1. Diferentes hongos endófitos y sus fuentes de extracción de metabolitos secundarios para el ensayo de germinación y crecimiento en placa Petri.

HONGO	FUENTE
<i>T. citrinoviride</i>	Filtrado Micelio
<i>T. ruber</i>	Filtrado Micelio
<i>E. tritici</i>	Filtrado Micelio
<i>A. tellustris</i>	Filtrado Micelio
CONTROL	Filtrado

Las placas preparadas se almacenaron en una cámara de cultivo IBERCEX, modelo IGCS 900 HR-LED, equipada con control de temperatura y humedad. La cámara se configuró a 25 °C y 70 % de humedad relativa. A los 14 días, se realizó el conteo de germinación, considerando como germinadas aquellas semillas cuya radícula superó los 5 mm. Posteriormente, se midió la plúmula y la radícula, utilizando una regla milimétrica.

#### 4.7. Ensayo de crecimiento en bandejas de alveolos

Se utilizó la mejor cepa del ensayo en placa Petri (*T. ruber*), empleando tanto el filtrado como el micelio, para realizar un ensayo de crecimiento en bandejas de alveolos de seis unidades, con alveolos de 100 cm<sup>3</sup>. Se dispusieron cuatro bandejas por tratamiento, es decir, cuatro repeticiones. Se siguió el mismo procedimiento para el tratamiento de las semillas que en el ensayo en placa. Durante todo el ensayo, las bandejas se mantuvieron en un invernadero con temperatura controlada entre 15 y 25 °C, ubicado en las instalaciones de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia

Se empleó un sustrato comercial para semilleros de uso hortícola, modelo Terrahum, suministrado por Klassman-Deilmann, para la siembra. El riego se aplicó dos veces por semana hasta alcanzar la capacidad de campo. Las bandejas fueron colocadas en un invernadero con temperatura controlada, mantenida entre 15 y 25 °C. Además, el invernadero disponía de luz artificial para completar un fotoperiodo de 16 horas diarias.

Cada siete días, se midió la altura de las plantas desde la base del sustrato hasta el último nudo. A las seis semanas, se tomaron lecturas finales con el sensor *Dualox* (*Pessl Instruments*), utilizado para medir el contenido de clorofila, el índice de contenido en flavonoles y el índice de contenido en antocianinas. Se midió siempre la hoja más joven. Finalmente, a las 6 semanas se dio por concluido el ensayo, registrando la longitud de la raíz, el peso seco de la plúmula y el peso seco de la radícula.

#### **4.8. Metabolitos secundarios de *T. ruber* como estrategia para mitigar el estrés salino en tomate**

Este ensayo tuvo como objetivo evaluar si la aplicación foliar de metabolitos secundarios extraídos de *T. ruber* permitía reducir el impacto de la salinidad en el cultivo de tomate.

##### **4.8.1. Localización, puesta en marcha y mantenimiento**

El estudio se llevó a cabo en un invernadero climatizado, ubicado en la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia (ETSIIAA). El sistema de climatización se programó para mantener la temperatura entre 15 y 25 °C.

Se emplearon semillas de la misma variedad empleada en ensayos previos, las cuales se sembraron en un sistema hidropónico de tipo *Nutrient Film Technique* (NFT). Este sistema constaba de tubos de PVC de 3 metros de longitud y 90 mm de diámetro (Figura 4.2) utilizando un total de 4 carriles para el ensayo (uno para cada tratamiento). Las plantas se dispusieron con una separación de 0,4 metros, obteniéndose un total de siete plantas por carril, y los tubos se colocaron con una separación de 0,80 metros. Cada tubería estaba equipada con una bomba de 300 L/h y un depósito de 30 litros. Para asegurar el flujo de la solución nutritiva, se estableció una pendiente del 1 %. La siembra se realizó en esponjas de poliéster (Figura 4.3), las cuales se introdujeron en vasos de polietileno de 50 ml (Figura 4.3) que servían como soporte dentro de los tubos de PVC.





FIGURA 4.2. Tubos PVC utilizados en el sistema hidropónico. Fuente: elaboración propia.



FIGURA 4.3. Vasos de polietileno de 50 ml (izquierda) y esponja de poliéster (derecha) utilizada para la siembra en cultivo hidropónico. Fuente: elaboración propia

La solución nutritiva utilizada fue la formulada por Hoagland y Arnon (1950), con los siguientes nutrientes y concentraciones: N (210 mg/L), P (31 mg/L), K (234 mg/L), Ca (200 mg/L), Mg (48 mg/L), S (64 mg/L), B (0,5 mg/L), Mn (0,5 mg/L), Zn (0,05 mg/L), Cu (0,02 mg/L), Mo (0,01 mg/L) y Fe (5 mg/L). Los fertilizantes empleados fueron fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), nitrato potásico ( $\text{KNO}_3$ ), nitrato cálcico ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) y sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4$ ).

Se colocaron tutores de rafia de 1,5 metros de altura (Figura 4.5). Al alcanzar dicha altura, se podó la yema apical para detener el crecimiento en altura de las plantas. Semanalmente, se realizaron podas para eliminar los brotes laterales y se llevó a cabo el tutorado.



FIGURA 4.4. Plantas tomate tutoradas con tutores rafia de 1,5 metros. Fuente: elaboración propia

#### 4.8.2. Tratamientos foliares con metabolitos

Se utilizaron metabolitos extraídos de *T. ruber* mediante el procedimiento previamente descrito, con la única diferencia de que en este caso solo se empleó el filtrado, dado que el micelio produce muy poca cantidad de metabolitos. Para, obtener una mayor cantidad de estos compuestos, se utilizaron cuatro matraces y se extrajeron los metabolitos de todos ellos.

El mismo día del tratamiento, los viales necesarios se resuspendieron en DMSO al 2,5 % y se diluyeron en agua destilada estéril, obteniendo una solución final de 100 ml con una concentración de 1 mg/ml de metabolitos, al igual que en el resto de ensayo como control se utilizaron los extractos obtenidos del medio de cultivo PDB sin inocular. La aplicación foliar se realizó con un pulverizador de 60 ml, asegurando una distribución homogénea sobre toda el área foliar de cada planta, aplicando un total de 7 ml por planta. Dos carriles se trataron con metabolitos de *T. ruber* y dos se trataron con solución de control.

Se efectuaron dos tratamientos foliares: el primero, al inicio de la floración del primer fruto, y el segundo, un mes después, cuando todos los pisos florales estaban formados y el primer piso alcanzaba el estadio de maduración del fruto.

#### 4.8.3. Tratamientos salinos

La concentración salina se obtuvo mediante la adición de cloruro sódico (NaCl) a la solución nutritiva, y su nivel se determinó con un conductímetro modelo HI99301 (Hanna Instruments). La conductividad de la solución se comprobó diariamente y se ajustó a los valores requeridos. El pH se midió con un medidor modelo HI98130 (Hanna Instruments) y, dado que siempre se mantuvo entre 5,5 y 6,5, no fue necesaria la adición de ácidos ni bases.

La solución Hoagland, utilizada como solución nutritiva control, presentó una conductividad eléctrica de  $2,0 \pm 0,2$  dS/m, determinada por los fertilizantes empleados. Esta solución se utilizó para el mantenimiento de todas las plantas hasta la primera aplicación de metabolitos. Para la solución nutritiva salina, la conductividad se incrementó hasta  $8,0 \pm 0,2$  dS/m, nivel que se mantuvo durante 30 días tras el primer tratamiento. Posteriormente, tras la segunda aplicación, la salinidad se incrementó hasta  $14,0 \pm 0,2$  dS/m.

#### 4.8.4. Mediciones realizadas

En este ensayo se llevaron a cabo mediciones fisiológicas utilizando el dispositivo DUALEX Scientific para determinar el contenido de clorofila ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), el índice de flavonoles

y el índice de antocianinas. Se realizaron tres mediciones por planta, evaluando todas las plantas del ensayo. La primera medición se realizó antes de la aplicación de los tratamientos con metabolitos y salinidad para comprobar la ausencia de diferencias significativas al inicio del ensayo. La segunda se llevó a cabo 30 días después del primer tratamiento, con todos los pisos florales formados y el primer piso en estado de maduración del fruto. La tercera medición se efectuó 30 días después del segundo tratamiento con todo los pisos florales en estadio de maduración del fruto. Una vez madurados los frutos se registró el peso individual de cada tomate, su diámetro y su contenido de sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix), determinado con un refractómetro digital marca Shibuya, modelo 14059. Una vez recogidos todos los frutos se registró el peso verde aéreo de todas las plantas.

#### 4.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa *Statgraphics Centurion XIX* (2024). Para evaluar el efecto de los distintos tratamientos sobre el porcentaje de germinación en el ensayo de placa Petri, se aplicó un test de chi-cuadrado con corrección de Yates, utilizando un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ .

En las mediciones de crecimiento en placa Petri y en bandeja de alveolos, tanto en la longitud de plúmula como de radícula, se verificó el cumplimiento de los supuestos de homocedasticidad de varianza y normalidad mediante los test de Bartlett y Shapiro-Wilk, respectivamente. Dado que todos los parámetros medidos cumplieron con estos criterios, se aplicó un ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ), seguido de la prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), para identificar diferencias significativas entre tratamientos. Ambos con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ .

Para el ensayo de tolerancia a la salinidad, se siguió el mismo procedimiento de verificación de supuestos estadísticos, confirmando el cumplimiento de homocedasticidad y normalidad con los test de Bartlett y Shapiro-Wilk. Posteriormente, se realizó un ANOVA de dos factores ( $\alpha = 0,05$ ) para evaluar el efecto de la salinidad, la aplicación de metabolitos y la interacción entre ambos sobre los diferentes parámetros medidos. Cuando la interacción mostró diferencias significativas, se aplicó un test de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para evaluar las diferencias entre los cuatro tratamientos.

## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análisis germinación en placa Petri

El test de chi-cuadrado indicó influencias significativas de los tratamientos en la germinación de las semillas de tomate (Tabla 5.1). Ningún tratamiento superó al control, por lo que se descartan mejoras significativas en la germinación. No obstante, se observaron descensos en el porcentaje de germinación en comparación con el control en los tratamientos con *A. tellustris* (micelio) y, especialmente, con *E. tritici* (micelio). En este último, la germinación se redujo hasta un 35 %, siendo significativamente menor que en el resto de los tratamientos, a excepción de *E. tritici* (filtrado) y *A. tellustris* (micelio), lo que sugiere un posible efecto inhibitorio.

TABLA 5.1.1. Matriz de chi-cuadrado con corrección de Yates que compara el porcentaje de germinación obtenido en los diferentes tratamientos realizados. Se incluye el % de germinación. NS: diferencias no significativas, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

	<i>A. tellustris</i> (Filtrado): 85%	<i>A. tellustris</i> (Micelio): 65%	<i>E. tritici</i> (Filtrado): 70%	<i>E. tritici</i> (Micelio): 35%	<i>T. ruber</i> (Filtrado): 80%	<i>T. ruber</i> (Micelio): 90%	<i>T. citrinoviride</i> (Filtrado): 95%	<i>T. citrinoviride</i> (Micelio): 90%	Control: 95%
<i>A. tellustris</i> (Filtrado): 85 %									
<i>A. tellustris</i> (Micelio): 65 %	NS								
<i>E. tritici</i> (Filtrado): 70 %	NS	NS							
<i>E. tritici</i> (Micelio): 35%	*	NS	NS						
<i>T. ruber</i> (Filtrado): 80%	NS	NS	NS	*					
<i>T. ruber</i> (Micelio): 90%	NS	NS	NS	**	NS				
<i>T. citrinoviride</i> (Filtrado): 95%	NS	*	NS	***	NS	NS			
<i>T. citrinoviride</i> (Micelio): 90%	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
Control: 95%	NS	NS	NS	***	NS	NS	NS	NS	

## 5.2. Análisis de crecimiento en placa Petri

Según el test ANOVA (Tabla 5.2), la longitud de raíz mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $F = 3,995$ ;  $p < 0,001$ ), mientras que la longitud de plúmula no presentó diferencias significativas ( $F = 1,425$ ;  $p = 0,226$ ).

TABLA 5.2. Información estadística del test ANOVA (grados de libertad, estadístico F y P-valor), correspondiente a la influencia de los diferentes tratamientos en la longitud de radícula y plúmula de las plántulas de tomate a los 14 días.

Parámetro analizado	Grados de libertad	Estadístico (F)	P-valor
Longitud raíz	8	3,995	<0,001
Longitud plúmula	8	1,425	0,226

En la longitud de plúmula se observó una mejora con el tratamiento de micelio de *T. ruber*, sin embargo, esta mejora no fue significativa en comparación con el control. También se detectó una disminución del crecimiento con los tratamientos de filtrado de *A. Tellustris* y *E. tellastris*, aunque estas inhibiciones tampoco fueron significativas respecto al control (Figura 5.1).

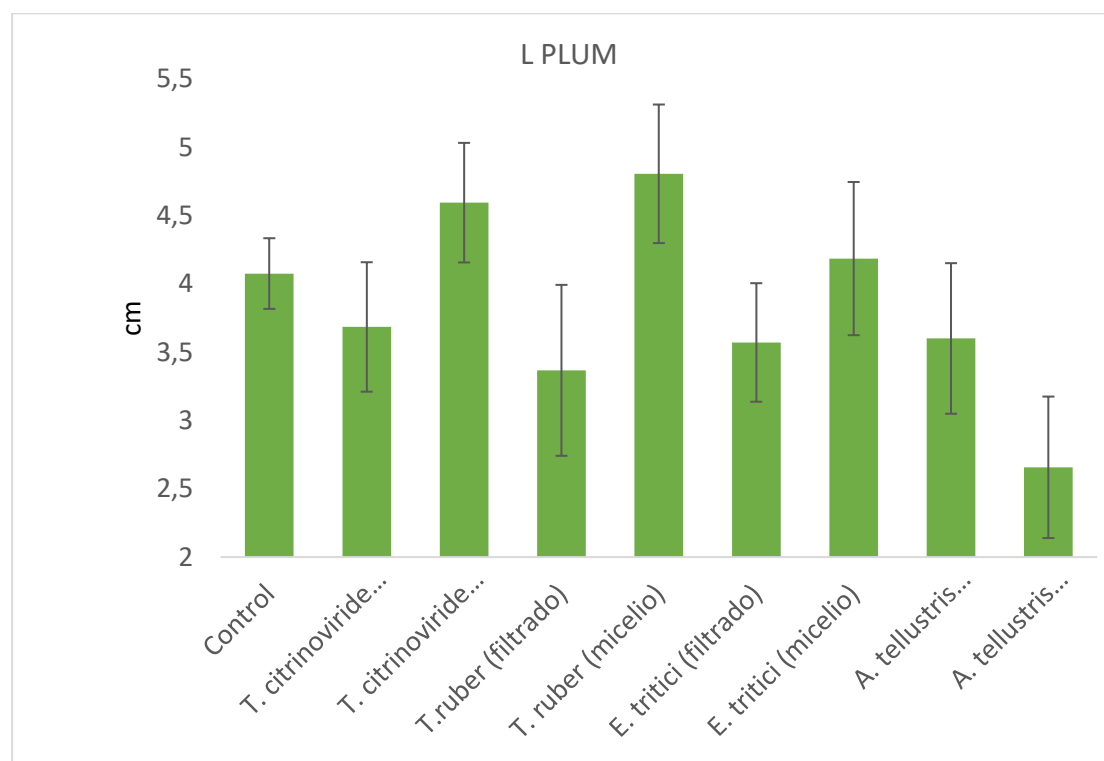


Figura 5.1. Longitud de la plúmula (las barras representan la media, y las líneas de error el error estándar) de las plántulas de tomate a las 14 días tras la siembra en Placa Petri.



El test de comparaciones múltiples de Tukey (Figura 5.2) mostró que ningún tratamiento mejoró significativamente al control en la longitud de la raíz, ni tampoco se detectaron tratamientos que fueran significativamente inferiores a este. No obstante, se observó una tendencia a la inhibición del crecimiento en algunos tratamientos, especialmente en aquellos que incluían el filtrado de *E. tritici* y tanto el filtrado como el micelio de *A. tellustris*.

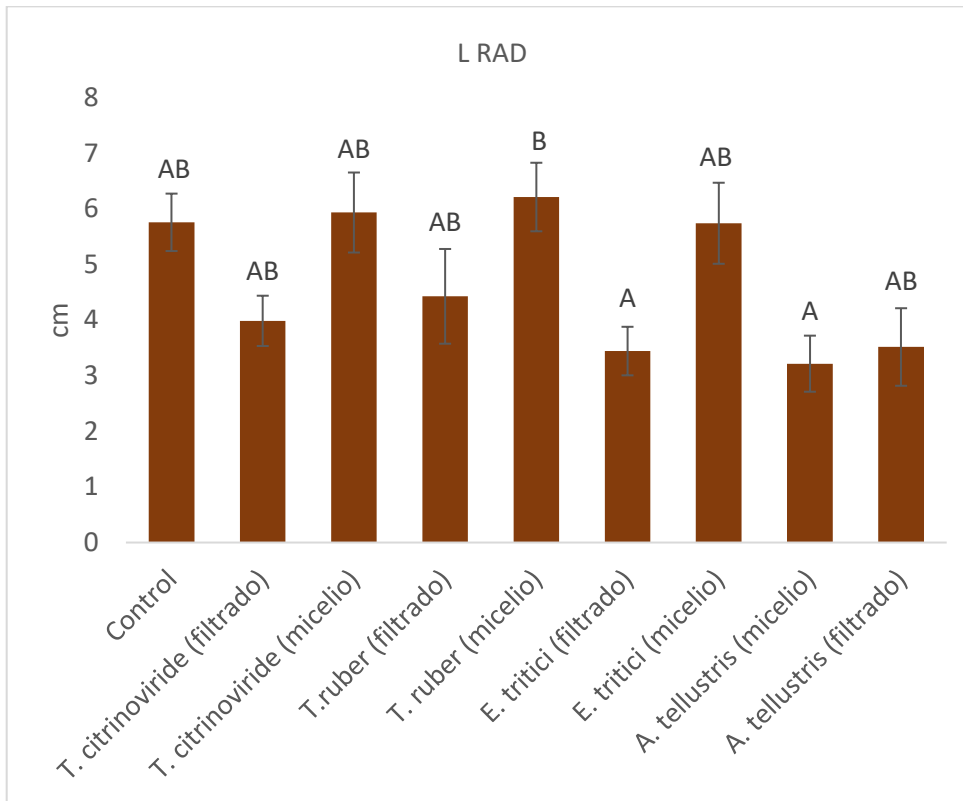


FIGURA 5.2. Longitud de la radícula (las barras representan la media, y las líneas de error el error estándar) de las plántulas de tomate a los 14 días tras la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos según el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### 5.3. Análisis de crecimiento en bandeja de alveolos

El ensayo en bandeja de alveolos se llevó a cabo utilizando metabolitos extraídos del filtrado y del micelio de *T. ruber*. Esta cepa fue seleccionada debido a que, según los resultados obtenidos en el ensayo en placa Petri, mostró los mejores resultados.

En las mediciones de altura realizadas en la segunda, tercera y cuarta semana, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, según el análisis de varianza (Tabla 5.3.). Sin embargo, en la quinta y sexta semana, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 5.3). Asimismo, los tratamientos influyeron de manera significativa en la longitud de la raíz, el peso seco de la raíz y el peso seco de la plúmula (Tabla 5.3). En contraste, las mediciones de contenido de clorofila, flavonoles y antocianinas no mostraron diferencias significativas en respuesta a los tratamientos aplicados (Tabla 5.3.).

TABLA 5.3. Información estadística de los test ANOVA, correspondiente a la influencia de los tratamientos en semilla sobre la longitud de plúmula, radícula, peso seco de plúmula, el peso seco de radícula, el contenido en clorofila, el índice de flavonoles y el índice de antocianinas de las plántulas de tomate a los 14 días.

Parámetro analizado	Grados de libertad	Estadístico ( <i>F</i> )	<i>P</i> -valor
Longitud plúmula 2ª semana	2	0,78	0,466
Longitud plúmula 3ª semana	2	0,67	0,5150
Longitud plúmula 4ª semana	2	1,16	0,3228
Longitud plúmula 5ª semana	2	3,79	0,0298
Longitud plúmula 6ª semana	2	3,64	0,0340
Longitud raíz 6ª semana	2	12,73	<0,001
Peso seco plúmula	2	3,50	0,0397
Peso seco raíz	2	34,78	<0,001
Contenido en clorofila	2	0,02	0,979
Índice de contenido en flavonoles	2	0,76	0,472
Índice de contenido en antocianinas	2	0,58	0,564

Durante la segunda, tercera y cuarta semana, los tratamientos con micelio y filtrado mostraron una tendencia de mejora en la longitud de la plúmula, aunque sin alcanzar diferencias significativas (Figura 5.3). Sin embargo, en las últimas dos semanas del ensayo, el tratamiento con micelio incrementó significativamente esta variable en comparación con el control, según el test de Tukey (Figura 5.3).

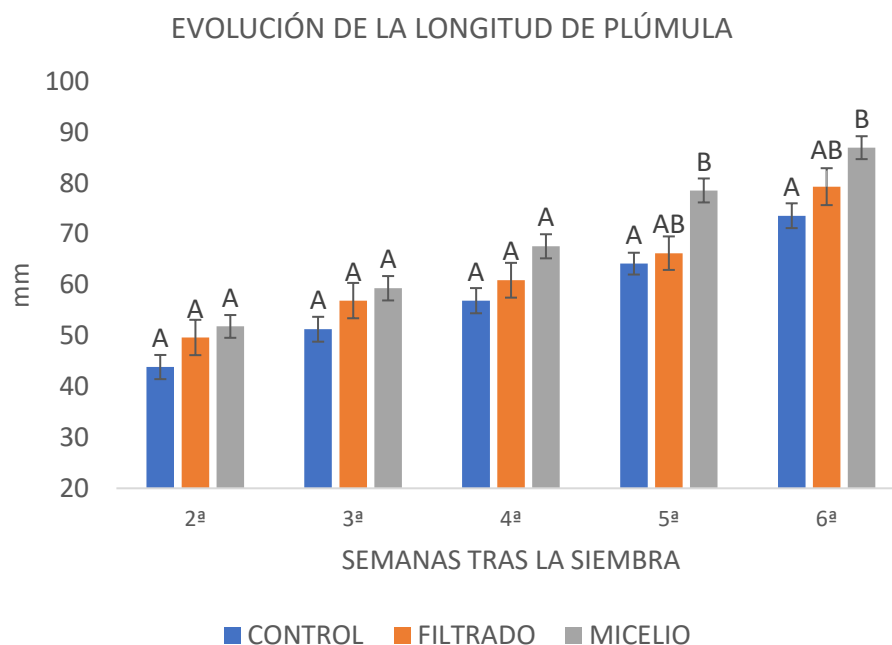


FIGURA 5.3. Evolución de la longitud de la plúmula (las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar) de las plántulas de tomate durante 6 semanas a partir de la siembra para los diferentes tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las semanas según el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

En la sexta semana, se realizaron mediciones de la longitud de la radícula, el peso de la plúmula y el peso de las radículas, así como evaluaciones fisiológicas con el sensor *DUALEX Scientific*. El test de comparaciones múltiples de Tukey mostró que los tratamientos con filtrado y micelio mejoraron significativamente la longitud de radícula en comparación con el control (Figura 5.4), observándose este mismo patrón en las mediciones de peso de raíz (Figura 5.5). En cuanto al peso de la plúmula, solo el tratamiento con filtrado presentó un incremento significativo respecto al control (Figura 5.6). Por otro lado, en las evaluaciones fisiológicas no se detectó ninguna tendencia de mejora por parte de ningún tratamiento en los diferentes parámetros medidos: contenido en clorofila, índice de flavonoles e índice de antocianinas (Figura 5.7).

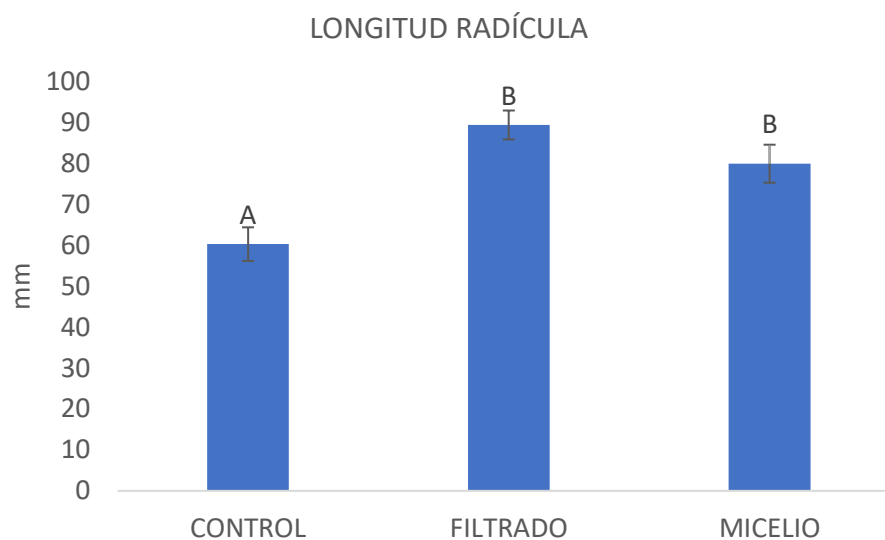


FIGURA 5.4. Longitud de la radícula (las barras representan la media, y las líneas de error el error estándar) de las plántulas de tomate a las 6 semanas tras la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las semanas según el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

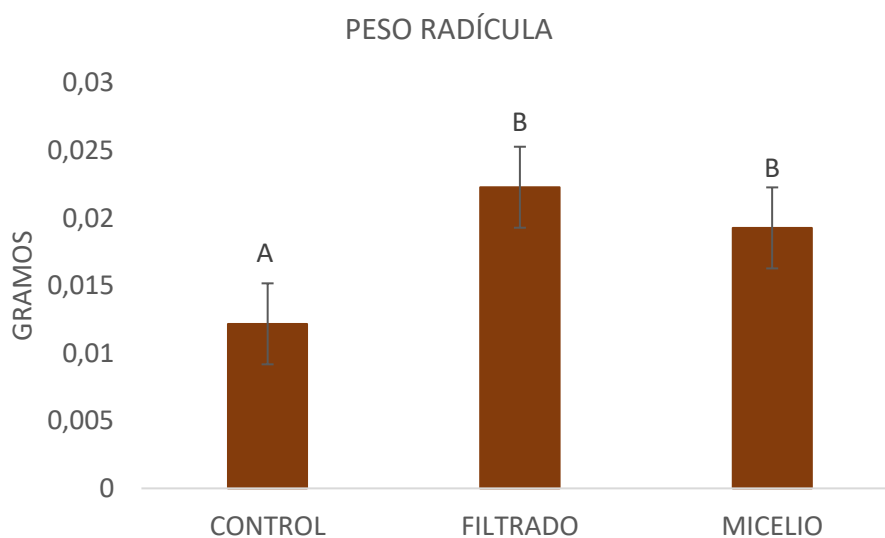


FIGURA 5.5. Peso de la radícula (las barras representan la media, y las líneas de error el error estándar) de las plántulas de tomate a las 6 semanas tras la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las semanas según el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

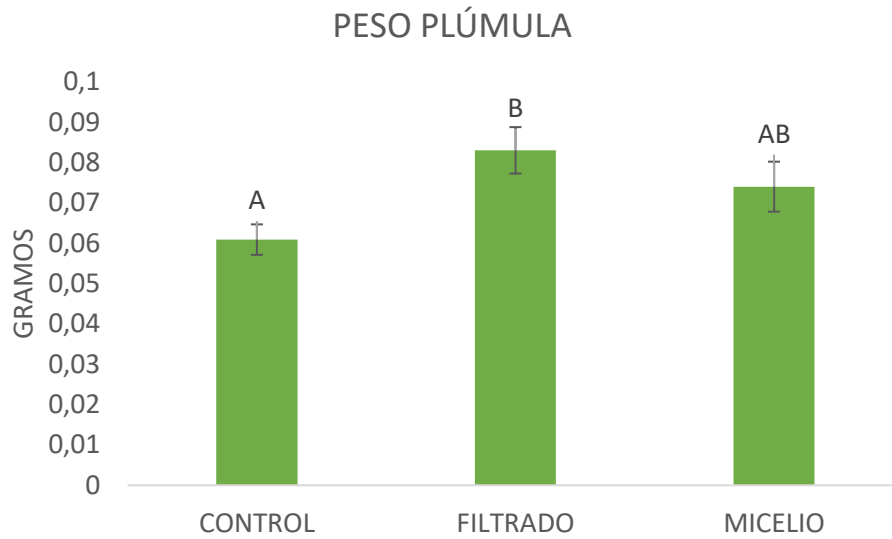


FIGURA 5.6. Peso de la plúmula (las barras representan la media, y las líneas de error el error estándar) de las plántulas de tomate a las 6 semanas tras la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las semanas según el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

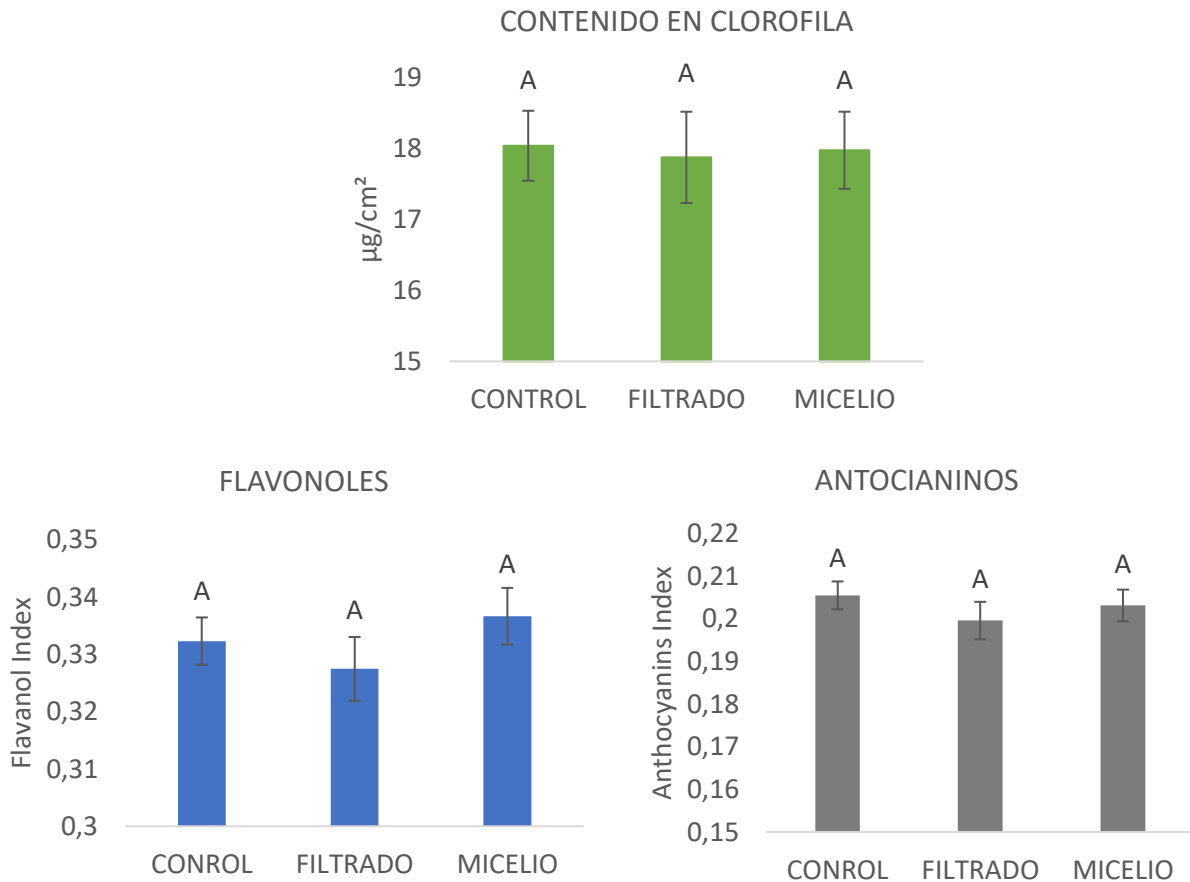


FIGURA 5.7 Contenido en clorofila, flavonoles y antocianinas medido con DUALEX (las barras representan la media, y las líneas de error el error estándar) de las plántulas de tomate a las 6 semanas tras la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las semanas según el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

## 5.4. Metabolitos secundarios de *T. ruber* como estrategia para mitigar el estrés salino en tomate

### 5.4.1. Medición inicial (antes de los tratamientos)

Antes de la aplicación de los tratamientos, se evaluaron los parámetros fisiológicos de todos los carriles que posteriormente se destinaran a los diferentes tratamientos realizados en el ensayo, con el fin de confirmar la homogeneidad de los datos iniciales. El análisis mediante ANOVA multifactorial indicó que no hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados ( $p > 0,05$ ). En el caso del contenido de clorofila, no se observaron efectos significativos de la salinidad ( $F = 1,08$ ;  $p = 0,3100$ ), la aplicación de metabolitos ( $F = 0,01$ ;  $p = 0,9287$ ) ni de la interacción entre ambos factores ( $F = 2,7$ ;  $p = 0,1137$ ). De manera similar, en el índice de flavonoles tampoco se detectaron diferencias significativas debidas a la salinidad ( $F = 1,56$ ;  $p = 0,2230$ ), a la aplicación de metabolitos ( $F = 0,08$ ;  $p = 0,7753$ ) o a la interacción entre ambos factores ( $F = 1,12$ ;  $p = 0,3004$ ). El análisis del índice de antocianinas arrojó resultados similares a los parámetros anteriores, sin efectos estadísticamente significativos de la salinidad ( $F = 0,51$ ;  $p = 0,4841$ ), los metabolitos ( $F = 0,09$ ;  $p = 0,7633$ ) ni su interacción ( $F = 0,26$ ;  $p = 0,6163$ ). Estos resultados indicaron que no existían diferencias previas entre los tratamientos en los parámetros evaluados, lo que permite atribuir cualquier cambio posterior a la aplicación de los metabolitos y/o la salinidad.

### 5.4.2 Segunda medición (30 días después del primer tratamiento)

Treinta días después del tratamiento con metabolitos, el ANOVA multifactorial evidenció diferencias significativas en algunos parámetros. El contenido de clorofila mostró diferencias significativas en respuesta a la salinidad ( $F = 15,78$ ;  $p < 0,001$ ) lo que indica que este factor tuvo un impacto notable en la acumulación de clorofila en hoja. Además, la interacción entre salinidad y metabolitos también fue significativa ( $F = 6,27$ ;  $p = 0,02$ ), lo que sugiere que los efectos de los metabolitos solo se manifestaron bajo condiciones de estrés salino. En contraste, la aplicación de metabolitos por sí sola no generó cambios significativos en la clorofila ( $F = 0,26$ ;  $p = 0,6122$ ).

En relación con el test de comparaciones múltiples (Figura 5.8) realizado con los cuatro tratamientos, se observó que el tratamiento salino con metabolitos presentó una concentración de clorofila significativamente superior a la de los tratamientos no salinos y al tratamiento salino sin metabolitos.

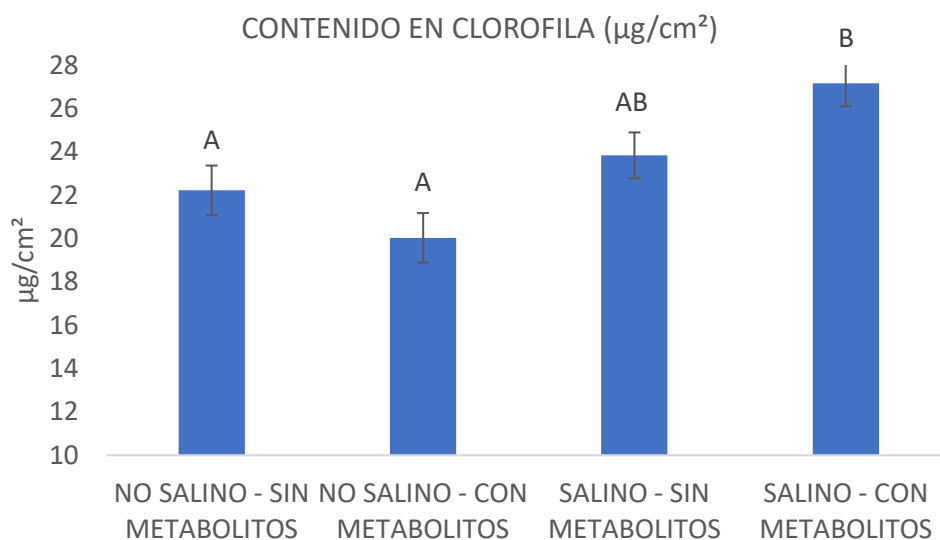


FIGURA 5.8. Influencia de la salinidad y la aplicación de metabolitos en el contenido de clorofila. Las barras muestran la media, y las líneas de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Los datos corresponden a plantas de tomate evaluadas 30 días después de la primera aplicación de metabolitos."

El índice de flavonoles no mostró diferencias significativas en respuesta a la salinidad ( $F = 0,11$ ;  $p = 0,7481$ ). Sin embargo, la aplicación de metabolitos presentó un valor  $p$  cercano al umbral de significancia ( $F = 3,81$ ;  $p = 0,0639$ ), lo que sugiere una posible tendencia a incrementar la acumulación de estos compuestos. Además, la interacción entre ambos factores fue significativa ( $F = 6,77$ ;  $p = 0,0163$ ). El test de comparaciones múltiples de Tukey reveló diferencias significativas entre tratamientos. En condiciones no salinas, las plantas sin metabolitos presentaron un índice de flavonoles superior al de aquellas tratadas con metabolitos (Figura 5.9).

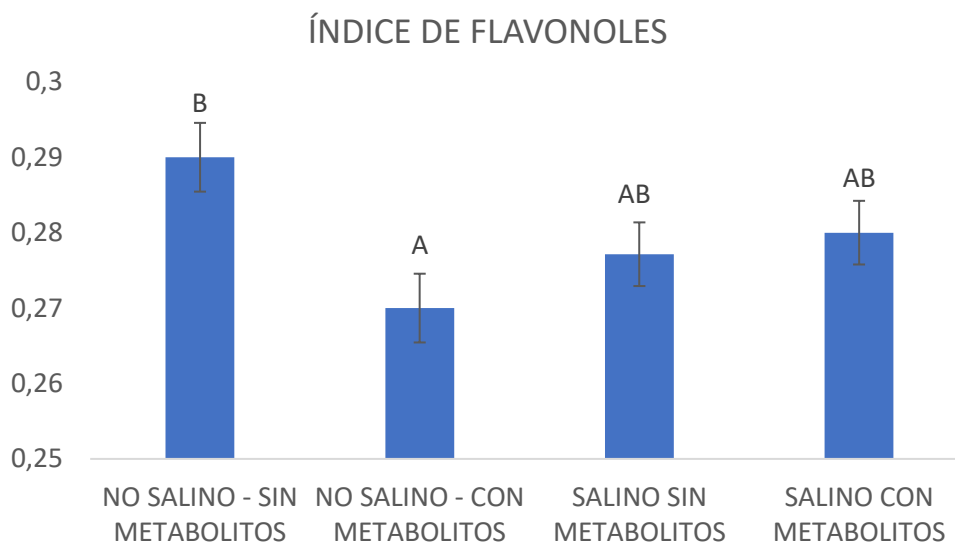


FIGURA 5.9. Influencia de la salinidad y la aplicación de metabolitos en el índice de flavonoles. Las barras muestran la media, y las líneas de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Los datos corresponden a plantas de tomate evaluadas 30 días después de la primera aplicación de metabolitos."

El índice de antocianinas mostró un efecto significativo de la salinidad ( $F = 12,34$ ;  $p = 0,002$ ), mientras que la aplicación de metabolitos no tuvo un impacto estadísticamente significativo ( $F = 0,09$ ;  $p = 0,7633$ ). No obstante, se observó una interacción significativa entre ambos factores ( $F = 6,00$ ;  $p = 0,023$ ). El test de comparaciones múltiples de Tukey indicó que el índice de antocianinas fue mayor en las plantas no expuestas a salinidad (Figura 5.10). Al comparar las cuatro combinaciones, se determinó que la aplicación de metabolitos no provocó un aumento en el índice de antocianinas, ni en condiciones de salinidad ni en ausencia de esta.



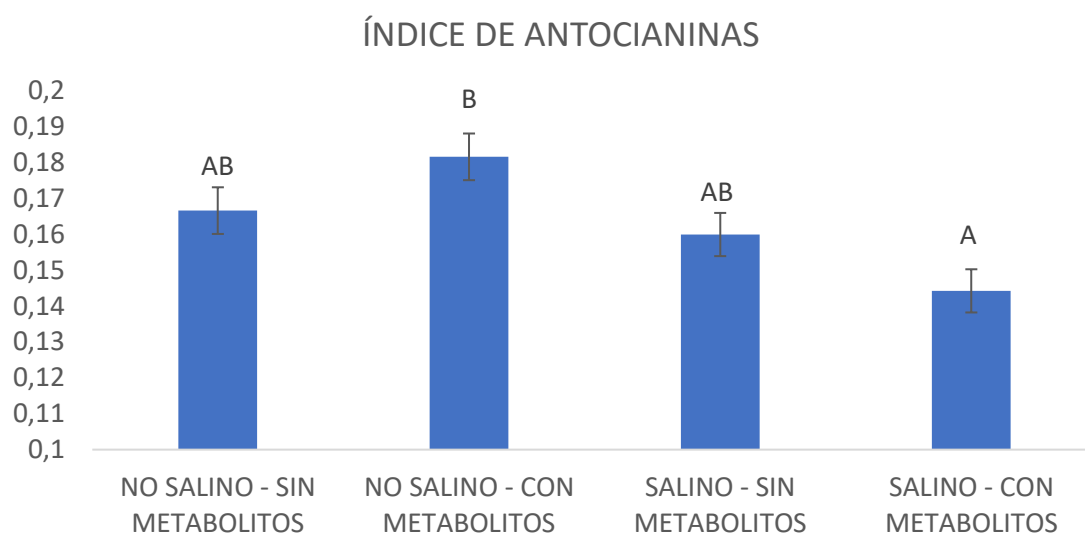


FIGURA 5.10. Influencia de la salinidad y la aplicación de metabolitos en el índice de antocianinas. Las barras muestran la media, y las líneas de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Los datos corresponden a plantas de tomate evaluadas 30 días después de la primera aplicación de metabolitos."

#### 5.4.3 Tercera medición (30 días después del segundo tratamiento)

Treinta días después de la segunda aplicación de metabolitos y con un nivel de salinidad mayor que en la evaluación previa se volvieron a repetir las mismas mediciones. Los resultados del ANOVA multifactorial evidenciaron cambios significativos en algunos de los parámetros evaluados.

En el contenido de clorofila no se observaron diferencias significativas en la interacción ( $F = 1,03$ ;  $p = 0,3217$ ). No obstante, se encontraron diferencias significativas en respuesta a la salinidad ( $F = 10,33$ ;  $p = 0,004$ ) y a la aplicación de metabolitos ( $F = 4,82$ ;  $p = 0,039$ ), lo que indica que ambos factores influyeron en la acumulación de este pigmento.

La Figura 5.11 muestra que el contenido de clorofila fue mayor en las plantas expuestas a salinidad en comparación con aquellas que crecieron en condiciones sin estrés. Independientemente del nivel de salinidad, las plantas tratadas con metabolitos presentaron un contenido de clorofila superior al de aquellas sin tratamiento (Figura 5.11).

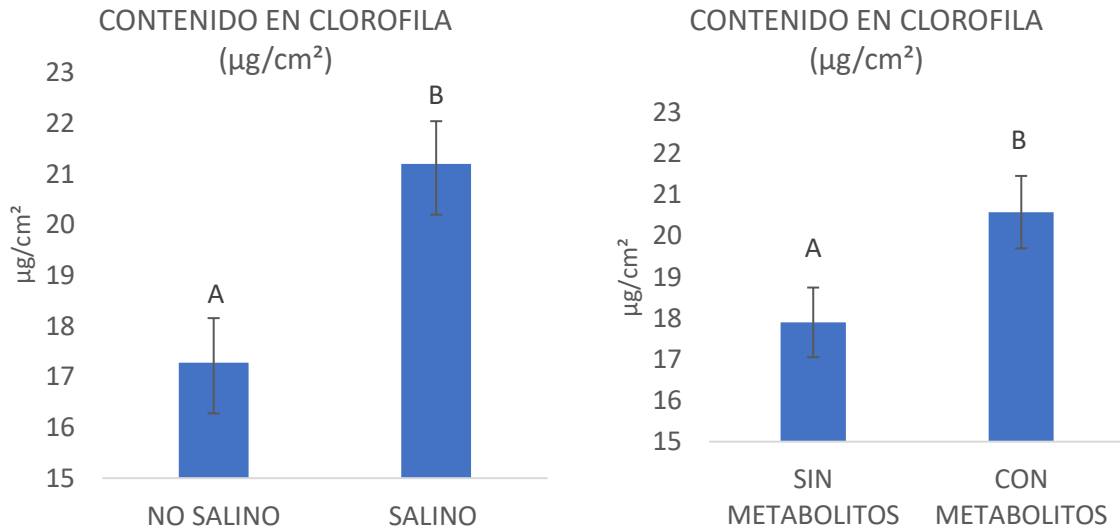


FIGURA 5.11. Influencia de la salinidad en el contenido de clorofila (gráfico superior izquierdo), influencia de la aplicación de metabolitos (gráfico superior derecho). Las barras representan la media, y las líneas de error, el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según el ANOVA de dos factores ( $\alpha = 0,05$ ). Los datos corresponden a plantas de tomate evaluadas 30 días después de la segunda aplicación de metabolitos.

En contraste, el índice de flavonoles no presentó efectos significativos para ninguno de los factores evaluados, ya que la salinidad ( $F = 0,24$ ;  $p = 0,627$ ), la aplicación de metabolitos ( $F = 0,09$ ;  $p = 0,764$ ) y la interacción entre ambos ( $F = 0,11$ ;  $p = 0,742$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, el índice de antocianinas presentó un efecto significativo tanto para la salinidad ( $F = 9,98$ ;  $p = 0,004$ ) como para la aplicación de metabolitos ( $F = 11,09$ ;  $p = 0,003$ ), aunque la interacción entre ambos factores no fue significativa ( $F = 2,18$ ;  $p = 0,154$ ). Como se observa en la Figura 5.12, la acumulación de antocianinas disminuyó con el aumento de la salinidad en las plantas tratadas con metabolitos, mientras que en las plantas sin metabolitos se mantuvo más estable.

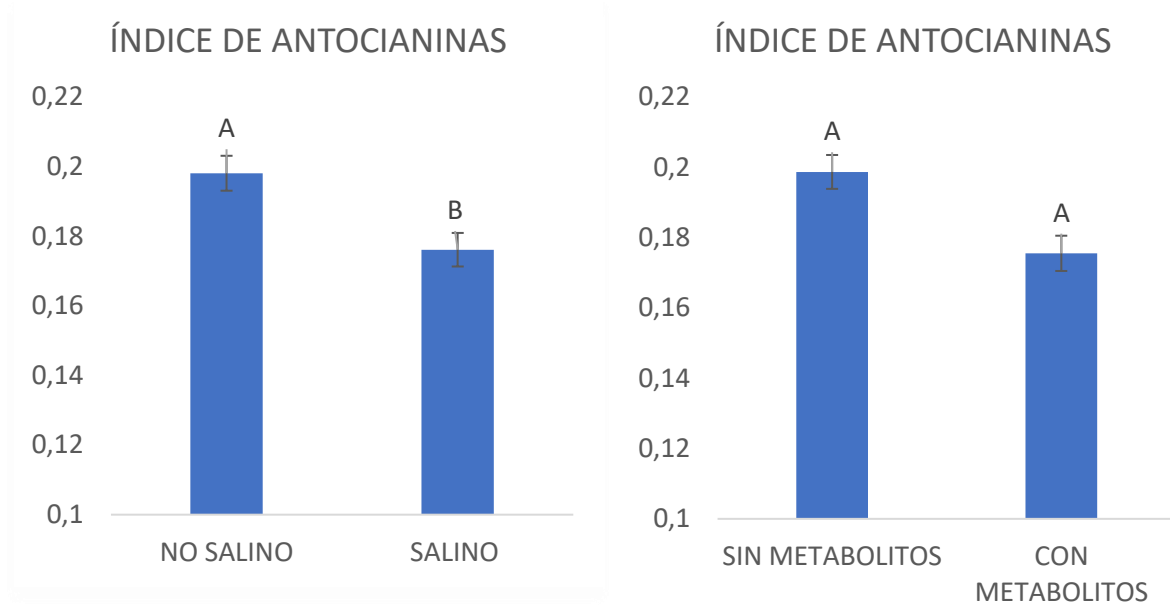


FIGURA 5.12. Influencia de la salinidad en el índice de antocianinas (gráfico superior izquierdo), influencia de la aplicación de metabolitos (gráfico superior derecho). Las barras representan la media, y las líneas de error, el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según el ANOVA de dos factores ( $\alpha = 0,05$ ). Los datos corresponden a plantas de tomate evaluadas 30 días después de la segunda aplicación de metabolitos.

#### 5.4.4 Medición de producción y biomasa aérea

En la producción total de tomates por planta la interacción entre salinidad y la aplicación de metabolitos resultó significativa ( $F = 8,97$ ;  $p = 0,006$ ). La salinidad presentó un efecto significativo ( $F = 23,97$ ;  $p = <0,001$ ) y la aplicación de metabolitos no provocó diferencias significativas ( $F = 0,16$ ;  $p = 0,693$ ).

Los tratamientos con salinidad provocaron una reducción considerable en la producción de biomasa (Figura 5.13). Además, en esta figura se observa que la aplicación de metabolitos no generó mejoras significativas, ni en condiciones salinas ni en ausencia de salinidad, según la prueba de Tukey. Por lo tanto, los metabolitos no han provocado ninguna diferencia significativa en ninguna de las dos condiciones.

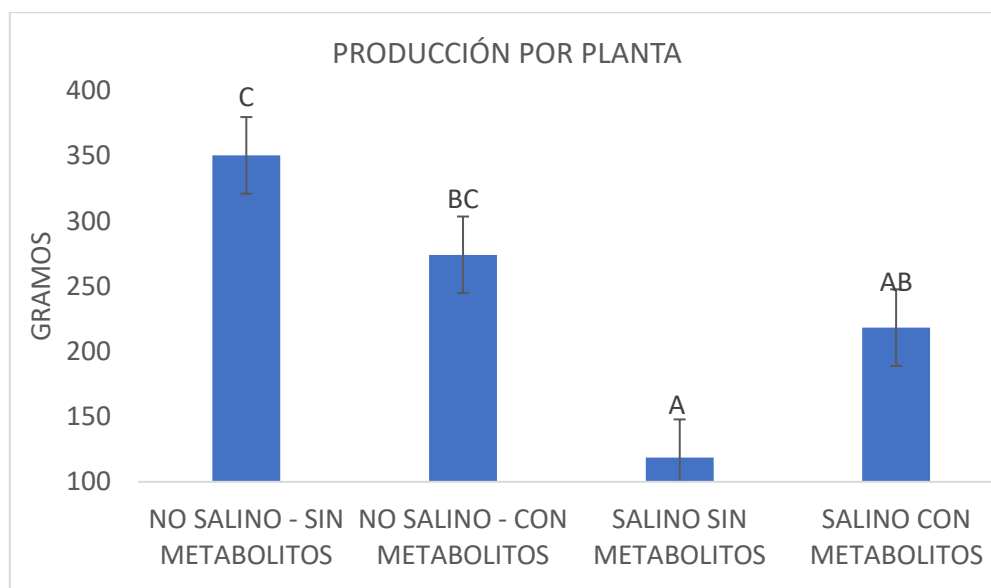


FIGURA 5.13. Influencia de la salinidad y la aplicación de metabolitos en la producción de tomates por planta. Las barras muestran la media, y las líneas de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Para el diámetro del fruto, la salinidad tuvo un impacto negativo significativo ( $F = 28,86$ ;  $p < 0,001$ ). Por otro lado, la aplicación de metabolitos mostró un efecto positivo ( $F = 4,40$ ;  $p = 0,0384$ ). Sin embargo, no se encontró una interacción significativa entre ambos factores ( $F = 2,03$ ;  $p = 0,1576$ ), lo que sugiere que el efecto de los metabolitos sobre el diámetro del tomate no dependió de la salinidad.

Aplicando el análisis de varianza se observó que los tratamientos sin salinidad presentaron un diámetro mayor que aquellos sometidos a condiciones salinas (Figura 5.14). Además, el mismo test confirmó que el diámetro medio del fruto fue superior en las plantas tratadas con metabolitos.

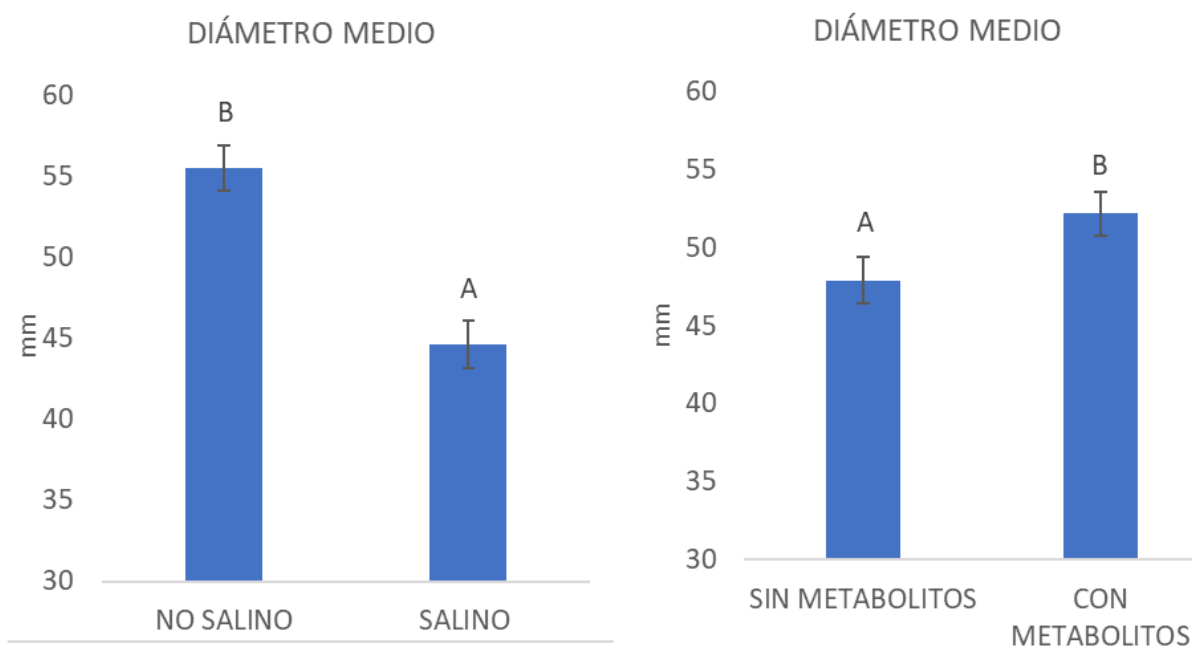


FIGURA 5.14. Influencia de la salinidad en el diámetro medio del fruto (gráfico izquierdo), influencia de la aplicación de metabolitos (gráfico derecho). Las barras representan la media, y las líneas de error, el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba ANOVA con un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ .

Respecto al contenido de sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix), ninguno de los factores evaluados presentó efectos significativos. Ni la salinidad ( $F = 0,14$ ;  $p = 0,7050$ ), ni los metabolitos ( $F = 0,01$ ;  $p = 0,9418$ ) afectaron esta variable, ni tampoco su interacción ( $F = 0,02$ ;  $p = 0,8845$ ). Esto indica que la calidad del fruto, en términos de sólidos solubles, se mantuvo constante independientemente de los tratamientos aplicados.

En cuanto al peso de la planta, los resultados del análisis de varianza mostraron que la salinidad influyó significativamente en el peso total de cada planta ( $F = 5,94$ ;  $p = 0,0248$ ), lo que evidencia su impacto en la biomasa vegetal (Figura 5.15). En cambio, la aplicación de metabolitos no presentó efectos significativos ( $F = 0,51$ ;  $p = 0,4822$ ), lo que sugiere que, bajo las condiciones evaluadas, no contribuyó a mejorar el crecimiento de las plantas. Asimismo, la interacción entre salinidad y metabolitos tampoco resultó relevante ( $F = 0,73$ ;  $p = 0,4035$ ).

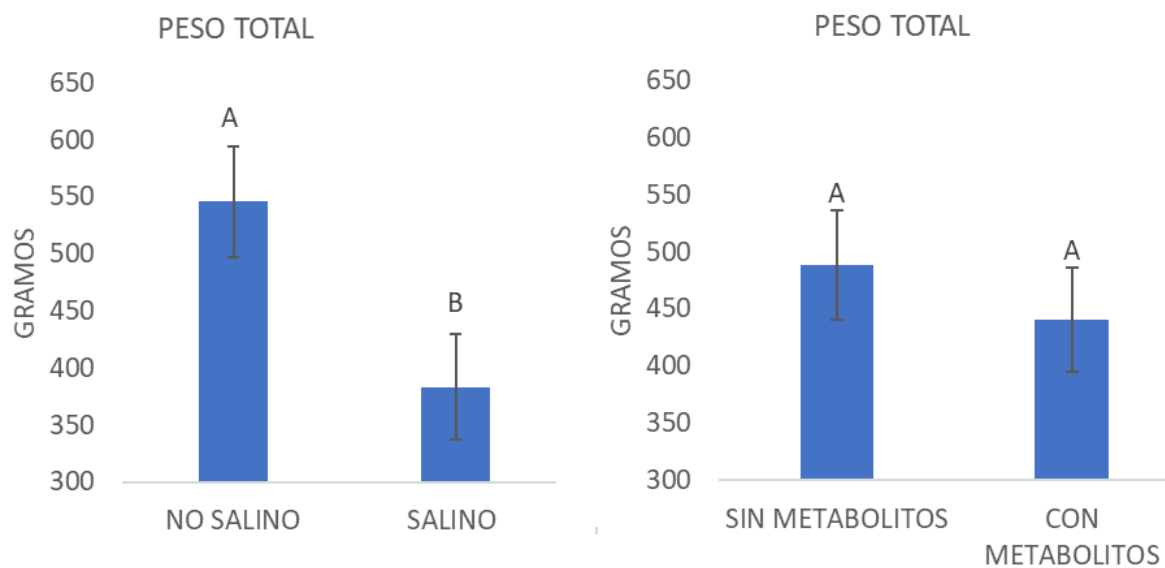


FIGURA 5.15. Influencia de la salinidad en el peso total de las plantas de tomate (gráfico izquierdo), influencia de la aplicación de metabolitos (gráfico derecho). Las barras representan la media y las líneas de error, el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey con un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ .

## **6. DISCUSIÓN**

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Ensayo en placa Petri

En este ensayo se estudió el efecto bioestimulante de los metabolitos secundarios extraídos de cuatro cepas de hongos endófitos en condiciones *in vitro*, con el objetivo de seleccionar la cepa más prometedora para un posterior ensayo *in vivo*. Los resultados obtenidos indicaron que la aplicación de extractos fúngicos de diferentes especies no solo no promovió una mejora significativa en la germinación de semillas de tomate en comparación con el control, sino que en algunos casos la redujo.

El test chi-cuadrado reveló diferencias significativas entre los tratamientos confirmando que el porcentaje de germinación estuvo influenciado por la aplicación de los extractos fúngicos. En particular, la germinación se redujo significativamente cuando las semillas fueron tratadas con los extractos del micelio de *A. tellustris* y *E. tritici*, siendo este último el más perjudicial, con solo un 35 % de germinación, valor significativamente inferior al de la mayoría de los tratamientos. Esta reducción podría atribuirse a la producción de metabolitos secundarios con efectos fitotóxicos, los cuales han sido reportados en diversas especies fúngicas (Jalander y Gachande, 2012).

Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Ogorek et al. (2020), quienes observaron una reducción en la germinación tras la aplicación de extractos de *E. nigrum* en semillas de remolacha, trigo y colza. Datos similares se encontraron en el estudio de Parveen et al. (2019), donde extractos de *Alternaria alternata* provocaron una inhibición total de la germinación en tomate. Sin embargo, es importante considerar que la producción y el tipo de metabolitos secundarios puede variar en función de la especie, como se demostró en un estudio con especies del género *Alternaria* (Benavidez et al., 2014). La cepa y las condiciones de fermentación también juegan un papel fundamental en la producción de metabolitos secundarios (Da silva et al., 2023).

Por otro lado, los extractos de los filtrados y micelios de *T. ruber* y *T. citrinoviride*, no mostraron efectos negativos en la germinación, presentando valores similares al control. Estos resultados indicaron que los metabolitos producidos por *T. ruber* y *T. citrinoviride* no afectaron la germinación de las semillas, lo que concuerda con estudios previos que han reportado la ausencia de efectos negativos en tomate tras la aplicación de extractos de *Trichoderma* (Parveen



et al., 2019) y también en tomate con extractos de *Epicoccum sorghinum*, (Balasubramaniam et al., 2024).

El uso de semillas certificadas de tomate, con un porcentaje de germinación del 95 % en el control, pudo haber limitado la detección de mejoras significativas, ya que en cultivos con una alta tasa de germinación inicial es menos probable observar incrementos significativos en este parámetro. En este sentido, el uso de especies con una tasa de germinación más baja podría permitir evaluar con mayor claridad el potencial bioestimulante de estos compuestos. Investigaciones previas han reportado mejoras en germinación tras la aplicación de metabolitos fúngicos en especies como cebada (Mathur et al., 2022) y soja (Waqas et al., 2012), donde los controles presentaban tasas de germinación del 60 y el 80 %, respectivamente lo que permitió que algunos tratamientos superaran significativamente este valor.

En cuanto a la longitud de la plúmula, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tratamientos, probablemente debido a la alta variabilidad de los datos dentro de cada tratamiento. El uso de un mayor número de réplicas en ensayos futuros podría reducir el error estándar y mejorar la precisión de los resultados, aumentando la probabilidad de detectar diferencias significativas si estas realmente existen.

Respecto a la longitud de la radícula, se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos, aunque ninguna de las variantes evaluadas mostró un efecto claramente beneficioso o perjudicial en comparación con el control. Pese a no observarse tendencias claras de mejora, se evidenció cierta inhibición en el tratamiento con metabolitos extraídos de micelio de *A. tellustris*, lo que confirma los efectos inhibitorios de este extracto. Resultados similares fueron reportados en ensayos donde extractos de *A. alternata* inhibieron el crecimiento de *Trigonella foenum-graecum* (Khokhar et al., 2013), lo que refuerza la hipótesis de que ciertos metabolitos de *A. tellustris* pueden tener efectos fitotóxicos. La ausencia de efectos beneficiosos en los tratamientos podría deberse a que, en esta fase inicial, las plantas aún cuentan con suficientes recursos provenientes de las reservas de los cotiledones, lo que limitaría la manifestación de respuestas positivas y permitiría observar principalmente efectos negativos. Sin embargo, en etapas más avanzadas de crecimiento, los metabolitos beneficiosos podrían desempeñar un papel más relevante y potenciar su efecto.

## 6.2. Ensayo de crecimiento en bandeja de alveolos

En este ensayo se evaluó el efecto de los metabolitos secundarios extraídos del micelio y el filtrado de *T. ruber* en condiciones *in vivo*, utilizando bandejas de alveolos. Esta cepa fue seleccionada debido a que, aunque las diferencias observadas en el ensayo en placa Petri no fueron significativas, presentó una tendencia positiva en el crecimiento. Para la evaluación, se emplearon tanto el micelio como el filtrado del hongo.

En las mediciones de altura, no se detectaron diferencias significativas hasta la quinta semana, momento en el que el tratamiento con extracto de micelio presentó un incremento significativo respecto al control. El tratamiento con filtrado mostró una tendencia al aumento, aunque en ninguna semana alcanzó significación estadística. Un mayor número de réplicas podría haber reducido la variabilidad de los datos, facilitando la detección de diferencias significativas en semanas previas. En las mediciones realizadas al final del ensayo, se observaron diferencias significativas en la longitud de la raíz, el peso de la plúmula y el peso de la radícula, lo que confirma el efecto bioestimulante de estos metabolitos secundarios en el cultivo de tomate bajo condiciones *in vivo* y temperatura controlada.

Estos resultados son congruentes con los obtenidos en un ensayo previo en tomate con extractos de *Alternaria leptinella*, en el que se lograron mejoras significativas en la longitud de la raíz (García-La Torre et al., 2024). Asimismo, se alinean con los hallazgos de otro estudio en tomate con extractos de *Epicoccum sorghinum*, donde se registró un incremento en el tamaño de las plántulas (Balasubramanian et al., 2024). Hasta la fecha, el uso de metabolitos secundarios extraídos de *T. ruber* no había sido evaluado como bioestimulante de plantas mediante tratamiento de semillas. No obstante, este género se considera una fuente relevante de metabolitos con propiedades bioactivas de interés en la agricultura (Zhai et al., 2016).

En relación con los parámetros fisiológicos evaluados, no se detectaron diferencias significativas, a pesar de los efectos observados en peso y altura. Esto concuerda con los resultados obtenidos por García-La Torre et al. (2023), quien reportó que el tratamiento de semillas de *Lolium multiflorum* con metabolitos secundarios de *Sarocladium terricola*, *Xylareaceae sp.* y *Fusarium avenaceum* mejoró el peso seco de la planta, así como la longitud de la plúmula y la radícula. Sin embargo, solo *S. terricola* y *Xylareaceae sp.* incrementaron significativamente la concentración de clorofila en hoja con respecto al control, mientras que

*F. avenaceum* no mostró este efecto. Estos resultados sugieren que las mejoras en peso y altura no siempre se traducen en cambios en los parámetros fisiológicos de la planta.

### **6.3. Efecto de los metabolitos secundarios extraídos de *T. ruber* y la salinidad en la fisiología y producción del tomate**

La inducción de tolerancia a la salinidad mediante la aplicación foliar de metabolitos secundarios extraídos de hongos endófitos ha sido poco estudiada. Este ensayo tuvo como objetivo evaluar si los metabolitos secundarios extraídos del filtrado de *T. ruber* provocaron un efecto bioestimulante en el cultivo de tomate bajo condiciones de salinidad y en ausencia de esta, así como su influencia en la producción y calidad del fruto.

Con todas las plantas bajo las mismas condiciones, se realizó la primera medición, la cual confirmó que no existían diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo tanto, las plantas presentaban características similares al inicio del ensayo.

En la segunda medición se observó que el contenido de clorofila en las hojas fue mayor en las plantas sometidas a salinidad en comparación con aquellas en condiciones no salinas. Este resultado contrasta con otros estudios en tomate, en los que un aumento en la salinidad redujo el contenido de clorofila en hoja (Zhang et al., 2016). Otra investigación en tomate indicó que los niveles más altos de clorofila se registraron en plantas cultivadas en ausencia de salinidad. Sin embargo, al evaluar diferentes niveles de salinidad, se observó que, dentro de las condiciones salinas, las plantas expuestas a la mayor concentración presentaron la mayor acumulación de clorofila (Trotta et al., 2024). Esto sugiere que la salinidad inicial de la solución nutritiva utilizada en este ensayo, con valores aproximados de  $2 \pm 0,2$  dS/m, pudo influir en los niveles de clorofila y que, al incrementar la salinidad a aproximadamente  $8 \pm 0,2$  dS/m, la concentración de clorofila aumentó. Otra causa podría haber sido que la salinidad provocara una reducción del área foliar, lo que podría haber aumentado la concentración de clorofila debido a que las hojas son más pequeñas

Dado que la interacción entre la concentración salina y metabolitos fue significativa, se realizó un test de comparaciones múltiples entre los cuatro tratamientos. Se observó que el tratamiento salino con metabolitos mostró una ligera tendencia a mejorar el contenido de clorofila en comparación con el tratamiento salino sin metabolitos. Esto sugiere que, bajo condiciones de estrés salino, los metabolitos podrían favorecer la acumulación de clorofila, lo que concuerda con otro ensayo en tomate, en el que mediante aplicaciones foliares con

*Alternaria terreus* se consiguió que con estrés por salinidad las plantas inoculadas con este hongo presentaron una mayor cantidad de clorofila en hoja (Abo Nouh et al., 2024). No obstante, sería interesante repetir el ensayo con un mayor número de réplicas para confirmar la tendencia observada en este ensayo.

En los tratamientos no salinos, se observó un aumento significativo en la concentración de flavonoles en las plantas que no recibieron la aplicación de metabolitos. Este fenómeno podría deberse a un efecto en el metabolismo de estas sustancias, lo que habría reducido su síntesis en las plantas tratadas con metabolitos (Gai et al., 2022). Para esclarecer este mecanismo, en ensayos futuros sería recomendable realizar análisis fisiológicos adicionales que permitan identificar qué compuestos relacionados con los flavonoles se ven afectados por la aplicación de los metabolitos.

Por otro lado, el índice de antocianinas aumentó en los tratamientos salinos, lo que contradice los resultados obtenidos por Alzahib et al. (2021), donde la salinidad redujo el contenido de estos compuestos. Además, la prueba de Tukey no mostró un efecto significativo de los metabolitos en el índice de antocianinas, lo que sugiere que la aplicación de los estos podría no estar relacionada con la acumulación de estas sustancias en la planta.

En la medición llevada a cabo con un nivel de salinidad mayor, la interacción entre todas las variables fisiológicas dejó de ser significativa, lo que sugiere que el efecto de los metabolitos no depende de la salinidad. El contenido de clorofila siguió aumentando con la salinidad, lo que contradice los estudios de Zhang et al. (2016) y Trotta et al. (2024). Sin embargo, los metabolitos, por sí solos, provocaron un aumento significativo en los niveles de clorofila (independientemente del nivel de salinidad), lo que indica que su aplicación podría favorecer su acumulación. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que los hongos endófitos pueden regular el metabolismo de las plantas, posiblemente a través de los metabolitos secundarios que producen (Li et al., 2023). Además, esta respuesta en los niveles de clorofila coincide con los resultados obtenidos mediante la aplicación de metabolitos secundarios extraídos de *Penicillium commune*, que lograron incrementar el contenido de clorofila en hojas de *Phaseolus vulgaris* (Ismail et al., 2021). Dado que los géneros *Talaromyces* y *Penicillium* presentan perfiles de metabolitos secundarios similares (Salvatore et al., 2024), los compuestos responsables del aumento en el contenido de clorofila podrían estar relacionados.

El índice de flavonoles no presentó diferencias significativas en la tercera medición, a diferencia de la segunda. Esto sugiere que el momento de aplicación de los metabolitos pudo ser un factor determinante en los efectos que estos generaron sobre el contenido de flavonoles. En contraste con la medición anterior en el índice de antocianinas, no se encontró significancia en la interacción, por lo que se descartó que la falta de eficacia de los metabolitos dependiera del nivel de salinidad. Además, las plantas en ausencia de salinidad mostraron un mayor índice de antocianinas, lo que concordó con la anterior medición.

La producción final por planta estuvo fuertemente condicionada por la salinidad, que redujo significativamente la producción. La aplicación de metabolitos de *T. ruber* no provocó mejoras significativas en la producción, en contraste con los ensayos de Imran et al. (2023), en los que se logró incrementar la producción final de tomates mediante la aplicación de extractos de *Trichoderma spp.* No obstante, el dato de producción por planta podría haber estado influenciado por la polinización, ya que al haberse realizado el ensayo en un invernadero, la ausencia de insectos polinizadores pudo haber sido un factor clave en la reducción del número de frutos (Toni et al., 2020). En futuros ensayos, la inclusión de polinizadores podría incrementar la cantidad de tomates por planta, lo que podría potenciar el efecto de los metabolitos.

El diámetro medio del fruto es un parámetro clave en la industria, dado que los calibres más altos tienen mayor valor comercial (Baquero et al., 2012). Los tratamientos salinos redujeron significativamente el diámetro medio, lo que probablemente provocaría que muchos de los frutos fueran clasificados como de segunda categoría y, por tanto, con un menor valor comercial (Unión Europea, 2011). Sin embargo, los tratamientos con metabolitos lograron aumentar el calibre del fruto independientemente de la salinidad, lo que indicó que la aplicación de estos compuestos permitió mejorar este parámetro clave. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ismail et al. (2021), quienes, mediante la aplicación de metabolitos extraídos de *Penicillium communis*, lograron mejorar las características comerciales de *Phaseolus vulgaris*.

La salinidad provocó una reducción significativa en el peso final de la planta. En cambio, la aplicación de metabolitos no generó ninguna alteración, lo que contradice otros ensayos, como los realizados por Imran et al. (2023) y García La-Torre et al. (2024), ambos en tomate, en los que la aplicación de metabolitos produjo incrementos significativos en el peso de la planta. No obstante, en dichos estudios, la medición del peso se llevó a cabo en los

primeros estadios de desarrollo, mientras que en el presente ensayo se realizó al final del ciclo productivo. Sería interesante utilizar los metabolitos utilizados en los ensayos anteriores pero esta vez aplicarlos periódicamente durante todo el ciclo productivo, para determinar si realmente dichos compuestos pueden llegar a mejorar la producción.

Los resultados de este ensayo han demostrado que los niveles de salinidad evaluados afectaron de manera significativa la fisiología de la planta, así como la producción final y el tamaño de los frutos. En consecuencia, dichos niveles de salinidad no son adecuados para el cultivo de tomate en estas condiciones. Por otro lado, se ha comprobado que los metabolitos interfieren en la fisiología vegetal y pueden contribuir al incremento del tamaño de los frutos, sin embargo, no han logrado inducir tolerancia al nivel de salinidad aplicado en este estudio. En futuras investigaciones, sería recomendable evaluar niveles de salinidad inferiores para determinar si los metabolitos pueden favorecer la tolerancia en condiciones menos extremas, incluyendo también un mayor número de aplicaciones.

## **7. CONCLUSIONES**

## 7. CONCLUSIONES

1. Los resultados de la prueba de germinación en placa Petri permitieron identificar metabolitos secundarios con efectos fitotóxicos, lo que facilitó la selección de la cepa más adecuada para su uso como bioestimulante en ensayos posteriores.
2. En el ensayo en bandeja de alveolos, los tratamientos con metabolitos extraídos del micelio y del filtrado de *T. ruber* mejoraron la longitud de plúmula, la longitud de radícula y el peso seco de ambas. Sin embargo, no se observaron mejoras en los parámetros fisiológicos evaluados.
3. La aplicación foliar de metabolitos secundarios extraídos del filtrado de *T. ruber* tuvo un efecto positivo en el diámetro del fruto. No obstante, en las mediciones fisiológicas no se evidenció una mejora clara atribuible a los compuestos utilizados.
4. Los metabolitos extraídos del filtrado de *T. ruber* no fueron efectivos para mitigar los efectos del estrés salino en las condiciones de este ensayo.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abo Nouh, F. A., Abu-Elsaoud, A. M., & Abdel-Azeem, A. M. (2024). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic fungi hosted wild plants. *Microbial Biosystems*, 9(1), 38-50. <https://doi.org/10.21608/mb.2024.355966>
- Adomako, M. O., Roiloa, S., & Yu, F. -H. (2022). Potential roles of soil microorganisms in regulating the effect of soil nutrient heterogeneity on plant performance. *Microorganisms*, 10(12), 2399. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122399>
- Alzahib, R. H., Migdadi, H. M., Al Ghamdi, A. A., Alwahibi, M. S., Ibrahim, A. A., & Al-Selwey, W. A. (2021). Assessment of morpho-physiological, biochemical and antioxidant responses of tomato landraces to salinity stress. *Plants*, 10(4), 696. <https://doi.org/10.3390/plants10040696>
- Balasubramaniam, S., Sakthivel, A., Ramesh, K., Manisseeri, C., Ganeshan, S., Subramani, M., & Gnanajothi, K. (2024). Bioprospecting of exopolysaccharides from the endophytic fungi *Epicoccum sorghinum* AMFS4, for its structure, composition, bioactivities and application in seed priming. *Natural Product Research*, 1-11. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2380012>
- Baquero, R., Balaguera-López, H., Alvarez-Herrera, J., Cardenas-Hernandez, J., & Pinzón, H. (2012). Efecto del número de racimos por planta sobre el rendimiento de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 4, 185-198. <https://doi.org/10.17584/rcch.2010v4i2.1240>
- Baron, N. C., & Rigobelo, E. C. (2022). Endophytic fungi: A tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology*, 13(1), 39–55. <https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1945699>

- Benavidez Rozo, M. E., Patriarca, A., Cabrera, G., & Fernández Pinto, V. E. (2014). Determinación de perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de especies del género *Alternaria* aisladas de tomate [10.1016/j.riam.2013.09.002]. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(2), 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.002>
- Capel, C., Fonseca, R., Ramón-Berenguel, R., Angosto, T., Lozano, R. y Capel, J. (2019). Resistencia a plagas de mutantes con distinta densidad de tricomas glandulares. Encuentro Internacional Phytoma España, 2019
- Celar, F., & Valič, N. (2005). Effects of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium roseum* culture filtrates on seed germination of vegetables and maize. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 112, 343-350.
- Comisión Europea. (2019). Para una Europa sostenible de aquí a 2030. Oficina de publicaciones de la Unión Europea. Disponible en: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/3b096b37-300a-11e9-8d04-01aa75ed71a1/language-es>
- da Silva, F. M. R., Paggi, G. M., Brust, F. R., Macedo, A. J., & Silva, D. B. (2023). Metabolomic Strategies to Improve Chemical Information from OSMAC Studies of Endophytic Fungi. *Metabolites*, 13(2), 236. <https://www.mdpi.com/2218-1989/13/2/236>
- dos Reis, G. A., Martínez-Burgos, W. J., Pozzan, R., Pastrana Puche, Y., Ocán-Torres, D., de Queiroz Fonseca Mota, P., Rodrigues, C., Lima Serra, J., Scapini, T., Karp, S. G., & Soccol, C. R. (2024). Comprehensive Review of Microbial Inoculants: Agricultural Applications, Technology Trends in Patents, and Regulatory Frameworks. *Sustainability*, 16(19), 8720. <https://doi.org/10.3390/su16198720>
- Dwisandi, R., Miranti, M., Widiastuti, A., Prismantoro, D., Awal, M., Mispan, M., Joshi, R., & Doni, F. (2024). Microbial secondary metabolites for modulating plant biotic stress resistance: Bridging the lab-field gap. *Plant Stress*, 15, 100720. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100720>

- El-Banna, M. F., & Mosa, A. (2024). Exogenous application of proline mitigates deteriorative effects of salinity stress in NFT closed-loop system: An ultrastructural and physio-biochemical investigation on hydroponically grown tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *Scientia Horticulturae*, 330, 113061. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113061>
- FAO. (2011). *Ahorrar para crecer: Un modelo de agricultura sostenible intensificada para agricultores de pequeña escala*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/4/i2215s/i2215s.pdf>
- FAO. (2013). *Guía para los responsables de las políticas de intensificación sostenible de la producción agrícola en pequeña escala*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado de <https://www.fao.org/4/i2215s/i2215s.pdf>
- FAO. (2023). *Intensificación sostenible de la agricultura*. Recuperado de <https://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/spi/es/>
- FAO. (2024). FAOSTAT. Recuperado el 2 de diciembre de 2024, de <https://www.fao.org/faostat/es/#data>
- Fundación Antama. (2015). *La razón por la que países europeos prohíben los cultivos transgénicos en sus fronteras*. Fundación Antama. Recuperado de <https://fundacion-antama.org/razon-paises-europeos-prohiben-cultivos-transgenicos/>
- Gai, Z., Wang, Y., Ding, Y., Qian, W., Qiu, C., Xie, H., Sun, L., Jiang, Z., Ma, Q., Wang, L., & Ding, Z. (2020). Exogenous abscisic acid induces the lipid and flavonoid metabolism of tea plants under drought stress. *Scientific Reports*, 10(1), 12275. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69080-1>
- García-Latorre, C., Rodrigo, S., & Santamaría, O. (2022). Protective Effects of Filtrates and Extracts from Fungal Endophytes on *Phytophthora cinnamomi* in *Lupinus luteus*. *Plants*, 11, 1455. <https://doi.org/10.3390/plants11111455>
- García-Latorre, C., Rodrigo, S., & Santamaria, O. (2024). Biological Control of *Pseudomonas syringae* in Tomato Using Filtrates and Extracts Produced by *Alternaria leptinellae*. *Horticulturae*, 10(4), 334. <https://www.mdpi.com/2311-7524/10/4/334>

- García-Latorre, C., Rodrigo, S., Marin-Felix, Y., Stadler, M., & Santamaria, O. (2023). Plant-growth promoting activity of three fungal endophytes isolated from plants living in dehesas and their effect on *Lolium multiflorum*. *Scientific Reports*, *13*(1), 7354. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34036-8>
- Halecker, S., Surup, F., Kuhnert, E., Mohr, K. I., Brock, N. L., Dickschat, J. S., Junker, C., Schulz, B., & Stadler, M. (2014). Hymenosetin, a 3-decalinoyltetramic acid antibiotic from cultures of the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Phytochemistry*, *100*, 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.01.018>
- Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circ. Calif. Agric. Exp. Stn.* **1950**, 347, 32.
- Hristov, J., Toreti, A., Pérez Domínguez, I., Dentener, F., Fellmann, T., Elleby, C., Ceglar, A., Fumagalli, D., Niemeyer, S., Cerrani, I., Panarello, L., & Bratu, M. (2020). *Analysis of climate change impacts on EU agriculture by 2050: JRC PESETA IV project – Task 3*. European Commission, Joint Research Centre. [https://joint-research-centre.ec.europa.eu/system/files/2020-05/pesetaiv\\_task\\_3\\_agriculture\\_final\\_report.pdf](https://joint-research-centre.ec.europa.eu/system/files/2020-05/pesetaiv_task_3_agriculture_final_report.pdf)
- Imran, M., Abo-Elyousr, K. A. M., Mousa, M. A. A., & Saad, M. M. (2023). Use of *Trichoderma* culture filtrates as a sustainable approach to mitigate early blight disease of tomato and their influence on plant biomarkers and antioxidants production. *Frontiers in Plant Science*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1192818>
- Ismail, M. A., Amin, M. A., Eid, A. M., Hassan, S. E., Mahgoub, H. A. M., Lashin, I., Abdelwahab, A. T., Azab, E., Gobouri, A. A., Elkelish, A., & Fouda, A. (2021). Comparative Study between Exogenously Applied Plant Growth Hormones versus Metabolites of Microbial Endophytes as Plant Growth-Promoting for *Phaseolus vulgaris* L. *Cells*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051059>
- Jackson, A. M., Whipps, J. M., & Lynch, J. M. (1991). Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *7*(4), 494–501. <https://doi.org/10.1007/BF00303376>

- Jalander V. & Gachande, B. (2012). Effect of fungal metabolites of some rhizosphere fungi on seed germination and seed growth of some pulses and cereals. *Science Research Reporter (An Internl. Journal)*. 2, 265-267.
- James, D., Gleena Mary, C. F., & K. Mathew, S. (2022). Evaluation of Culture Filtrates of Endophytic Microorganisms from Tomato against *Ralstonia solanacearum*. *International Journal of Environment and Climate Change*, 12(12), 1476–1481. <https://doi.org/10.9734/ijecc/2022/v12i121589>
- Janssen, D., García, C., Ruiz, L., de Cara-García, M., Simon, A. and Martinez, A. (2018). Disease resistance in tomato crops produced in Spain. *Acta Hortic.* 1207, 63-68 DOI:10.17660/ActaHortic.2018.1207.8
- Karačić, V., Miljaković, D., Marinković, J., Ignjatov, M., Milošević, D., Tamindžić, G., & Ivanović, M. (2024). *Bacillus* Species: Excellent Biocontrol Agents against Tomato Diseases. *Microorganisms*, 12(3), 457. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030457>
- Khokhar, M., Rawal, P., & Mathure, A. C. (2013). Effect of Fungal Metabolites on Seed Viability and Seedling Vigour of Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 41, 2011.
- Larriba, E., Yaroshko, O., & Pérez-Pérez, J. M. (2024). Recent Advances in Tomato Gene Editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2606. <https://doi.org/10.3390/ijms25052606>
- Li, Z., Xiong, K., Wen, W., Li, L., & Xu, D. (2023). Functional Endophytes Regulating Plant Secondary Metabolism: Current Status, Prospects and Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1153. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/2/1153>
- Litskas, V., Migeon, A., Navajas, M., Marie-Stephane, T., & Stavrinides, M. (2019). Impacts of climate change on tomato, a notorious pest and its natural enemy: Small scale agriculture at higher risk. *Environmental Research Letters*, 14. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab3313>

- Mair, P., & Wilcox, R. (2020). Robust statistical methods in R using the WRS2 package. *Behavior Research Methods*, 52(2), 464–488. <https://doi.org/10.3758/s13428-019-01246-w>
- Maroto, J.V.; Baixauli, C. 2017: Cultivos hortícolas al aire libre. Serie Agricultura 13. Cajamar, Caja Rural.
- Mathur, P., Chaturvedi, P., Sharma, C., & Bhatnagar, P. (2022). Improved seed germination and plant growth mediated by compounds synthesized by endophytic *Aspergillus niger* (isolate 29) isolated from *Albizia lebeck* (L.) Benth. *3 Biotech*, 12(10), 271. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03332-x>
- M'Henni, Y., Ben Salem, I., Souli, M., Tounsi, S., Debieu, D., Fillinger, S., & Boughalleb, N. (2022). Biocontrol and Growth Promotion Potential of Combined Application of *Trichoderma simmonsii* and *Aspergillus westerdijkiae* Against Apple Tree Dieback Disease. *PhytoFrontiers*, 2, 268-279. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-01-22-0005-R>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2022). Anuario de Estadística Agroalimentaria. Superficie y Producciones de Cultivos. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx>
- Montanarella, L., & Panagos, P. (2020). The relevance of sustainable soil management within the European Green Deal. *Land Use Policy*, 100, 104950. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2020.104950>
- Muhammad, M., Basit, A., Ali, K., Ahmad, H., Li, W.-j., Khan, A., & Mohamed, H. I. (2024). A review on endophytic fungi: a potent reservoir of bioactive metabolites with special emphasis on blight disease management. *Archives of Microbiology*, 206(3), 129. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03828-x>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024). *Taxonomy browser: Solanum lycopersicum*. Retrieved December 1, 2024, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Noleppa, S., & Cartsburg, M. (2021). *The socio-economic and environmental values of plant breeding in the EU and for selected EU member states*. HFFA Research Paper 2021.

- Ogórek, R., Przywara, K., Piecuch, A., Cal, M., Lejman, A., & Matkowski, K. (2020). Plant–Fungal Interactions: A Case Study of *Epicoccum nigrum* Link. *Plants*, 9(12), 1691. <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/12/1691>
- Pablo, C. H. (2020). Plant growth-promoting characteristics of root fungal endophytes isolated from a traditional Cordillera rice landrace. *Studies in Fungi*, 5, 536-549. <https://doi.org/10.5943/sif/5/1/34>
- Parveen, S., Wani, A. H., & Yaqub, M. (2019). Effect of culture filtrates of pathogenic and antagonistic fungi on seed germination of some economically important vegetables. *Brazilian Journal of Botany*, 6, 133-139. <https://doi.org/10.21472/bjbs.061212>
- Poveda, J., Baptista, P., Sacristán, S., & Velasco, P. (2022). Editorial: Beneficial effects of fungal endophytes in major agricultural crops. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1061112. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1061112>
- Rodrigo, S., García-Latorre, C., & Santamaria, O. (2022). Metabolites Produced by Fungi against Fungal Phytopathogens: Review, Implementation and Perspectives. *Plants*, 11(1), 81. <https://doi.org/10.3390/plants11010081>
- Salvatore, M. M., Nicoletti, R., Fiorito, F., & Andolfi, A. (2024). Penicillides from *Penicillium* and *Talaromyces*: Chemical Structures, Occurrence and Bioactivities. *Molecules*, 29(16), 3888. <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/16/3888>
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K., & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9), 996-1004. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006342>
- Sher, A., Sarwar, T., Nawaz, A., Ijaz, M., Sattar, A., & Ahmad, S. (2019). Methods of Seed Priming. In M. Hasanuzzaman & V. Fotopoulos (Eds.), *Priming and pretreatment of seeds and seedlings: implication in plant stress tolerance and enhancing productivity in crop plants* (pp. 1-10). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1_1)



- Smirnov, O., Lahav, G., Orbell, J., Zhang, M., & Xiao, T. (2023). Climate Change, Drought, and Potential Environmental Migration Flows Under Different Policy Scenarios. *International Migration Review*, 57(1), 36-67. <https://doi.org/10.1177/01979183221079850>
- Toni, H., Djossa, B., Ayanan, M., & Teka, O. (2020). Tomato (*Solanum lycopersicum*) pollinators and their effect on fruit set and quality. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 96, 1-13. <https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1773937>
- Trotta, V., Russo, D., Rivelli, A. R., Battaglia, D., Bufo, S. A., Caccavo, V., Forlano, P., Lelario, F., Milella, L., Montinaro, L., Scrano, L., & Brienza, M. (2024). Wastewater irrigation and *Trichoderma* colonization in tomato plants: effects on plant traits, antioxidant activity, and performance of the insect pest *Macrosiphum euphorbiae*. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(12), 18887-18899. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32407-w>
- Ullah, A., Bano, A., & Khan, N. (2021). Climate change and salinity effects on crops and chemical communication between plants and plant growth-promoting microorganisms under stress. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 618092. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.618092>
- Unión Europea. (2011). Reglamento de ejecución (UE) n° 543/2011 de la Comisión, de 7 de junio de 2011, por el que se establecen normas de aplicación del Reglamento (CE) n° 1234/2007 del Consejo en lo que atañe a los sectores de las frutas y hortalizas y de las frutas y hortalizas transformadas <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02011R0543-20210101&from=EN>
- Van Dijk, M., Morley, T., Rau, M. L., & Saghai, Y. (2021). A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050
- Verma, H., Kumar, D., Kumar, V., Kumari, M. S., Singh, S. K., Sharma, V. K., Droby, S., Santoyo, G., White, J. F., & Kumar, A. (2021). The Potential Application of Endophytes in Management of Stress from Drought and Salinity in Crop Plants. *Microorganisms*, 9.

- Waqas, M., Khan, A., Hamayun, M., Kang, S.-M., Kim, Y.-H., & Lee, I.-J. (2012). Assessment of endophytic fungi cultural filtrate on soybean seed germination. *African Journal of Biotechnology*, 11, 15135-15143. <https://doi.org/10.5897/AJB11.4244>
- Zhai, M. M., Li, J., Jiang, C. X., Shi, Y. P., Di, D. L., Crews, P., & Wu, Q. X. (2016). The Bioactive Secondary Metabolites from *Talaromyces* species. *Nat Prod Bioprospect*, 6(1), 1-24. <https://doi.org/10.1007/s13659-015-0081-3>
- Zhang, S., Gan, Y., & Xu, B. (2016). Application of Plant-Growth-Promoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01405>