UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DE LA MITIGACIÓN DE ESTRÉS POR SALINIDAD EN RÁBANO (*Raphanus sativus* L.) MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE HONGOS HALOTOLERANTES

Trabajo de grado para optar al título de *Magister Scientiae* en Microbiología

SILVIA FERNANDA SILVA VELANDIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO INTERFACULTADES
MAESTRÍA EN CIENCIAS- MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ
2022

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DE LA MITIGACIÓN DE ESTRÉS POR SALINIDAD EN RÁBANO (*Raphanus sativus* L.) MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE HONGOS HALOTOLERANTES

Trabajo de grado para optar al título de *Magister Scientiae* en Microbiología

SILVIA FERNANDA SILVA VELANDIA

Dirigido por:

JIMENA SÁNCHEZ NIEVES

Bacterióloga. MSc Microbiología. Candidata PhD.

Profesora asociada. Área: microbiología. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Codirigido por:

LUZ MARINA MELGAREJO MUÑOZ

Bióloga. PhD en Ciencias Químicas.

Profesora titular. Área: fisiología vegetal. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

POSGRADO INTERFACULTADES

MAESTRÍA EN CIENCIAS- MICROBIOLOGÍA

BOGOTÁ

2022

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

MITIGATION OF SALT STRESS IN RADISH (Raphanus sativus) BY HALOTOLERANT FUNGI INOCULATION

Thesis submited for the degree of Master of Science in Microbiology

SILVIA FERNANDA SILVA VELANDIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO INTERFACULTADES
MAESTRÍA EN CIENCIAS- MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ
2022

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por ser mi motivación para salir adelante y lograr todo lo que en algún momento le prometí.

A mi papá, por enseñarme desde niña la importancia de la disciplina y la responsabilidad en todos los trabajos que uno realice.

A mi nonita, por ser la persona que siempre ha estado para mi, por su apoyo incondicional, sus cuidados y amor.

A Isaac, mi compañía, por su alegría, cariño y consejos.

A mi primo Joseph, por explicarme y responder mis constantes preguntas sobre temas de estadística.

A la profesora Jimena, por su orientación durante todo este proceso y por la ayuda que me brindó, no solo en la parte académica. Por escucharme y responderme siempre con amabilidad.

A la profesora Luz Marina, por darme la oportunidad de trabajar con ella estos meses, por recibirme en su grupo y permitirme aprender más acerca del área de fisiología vegetal.

También al área administrativa y operativa de la Mina de Sal de Zipaquirá, a María Angélica Leal, David Tovar y Andrés Romero por la cooperación y apoyo durante la etapa de muestreo.

Declaración de obra original

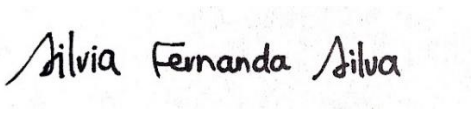
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



_____

Silvia Fernanda Silva Velandia
CC. 1032497604
Fecha 25/11/2022

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN ……1

2. ABSTRACT……..2

3. INTRODUCCIÓN…….....3

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN ……..4

5. HIPÓTESIS…….…5

6. OBJETIVOS……..……5

7. MARCO TEÓRICO

7.1. Hongos halófilos y halotolerantes……..…5

7.2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal……...8

7.3. Mitigación del estrés abiótico……....12

7.4. Salinización de los suelos……..13

7.5. Estrés por salinidad en plantas……14

7.6. Rábano (*Raphanus sativus* L)……..15

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Identificación preliminar de los aislamientos fúngicos……..16

8.2. Prueba de halotolerancia…….....17

8.3. Fase I: Ensayos *in vitro*

a) Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfatos…….……..17

b) Evaluación de la producción de ácido indolacético (AIA)…….……..18

c) Evaluación de la actividad de la enzima ACC desaminasa……...19

d) Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica……21

8.4. Fase II: Efectos sobre la germinación *in vitro*

a) Preparación y aplicación de los inóculos……..22

b) Porcentaje de germinación, longitud y vigor……22

8.5. Fase III: Efectos sobre el crecimiento vegetativo y fisiología

8.5.1. Montaje del bioensayo en condiciones de invernadero……23

8.5.2. Evaluación de las variables de crecimiento y fisiología

a) Longitud total y diámetro máximo del tubérculo……24

b) Número de hojas y área foliar del dosel……..…..24

c) Biomasa seca……..……..25

d) Fluorescencia de la clorofila a: Fv/ Fm y PI_{abs} ……..25
e) Pigmentos foliares: clorofilas totales y carotenoides…….....25
f) Conductancia estomática……26
g) Contenido de agua en órganos…….....26
h) CHR en discos foliares……....26
i) Contenido de prolina……....27

8.6. Tratamiento estadístico de los datos
a) Univariante……...28
b) Multivariante……...28

9. RESULTADOS……28
10. DISCUSIÓN……51
11. CONCLUSIONES ……..79
12. RECOMENDACIONES ……80
13. ANEXOS
- Curvas de calibración……81
- Tablas adicionales……..……..83
- Diagramas Boxplot……..……85
- Composición de medios de cultivo……..104

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS……..……..106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados mecanismos de promoción del crecimiento vegetal In *vitro*
Tabla 2. Resultados de prueba de degradación de carboximetil-celulosa
Tabla 3. Efecto de la inoculación sobre variables de germinación *in vitro* en rábano
Tabla 4. Efecto de la inoculación sobre variables de crecimiento en condiciones de invernadero
Tabla 5. Efecto de la inoculación sobre variables de fluorescencia de la clorofila a y pigmentos
Tabla 6. Efecto de la inoculación sobre variables de estado hídrico y contenido de prolina
Tabla 7. Puntaje de efectividad de los hongos en mecanismos de promoción del crecimiento *in vitro*
Tabla 8. Puntaje de efectividad de los hongos sobre la germinación *in vitro* de semillas de rábano
Tabla 9. Puntaje de efectividad de los hongos sobre el crecimiento y variables fisiológicas de rábano en condiciones de invernadero

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista macroscópica y microscópica de los cuatro hongos creciendo en medio PDA
Figura 2. Prueba de halotolerancia
Figura 3. Matriz de correlaciones para las variables de crecimiento y fisiología
Figura 4. Análisis de componentes principales para las variables de crecimiento y fisiología
Figura 5. Análisis de clúster o de agrupamiento

ANEXOS

Tablas

Tabla A. Cambio de pH en medio Pikovskaya (PVK)
Tabla B. Factores de conversión kit Spectroquant (Merck)
Tabla C. Resumen de tratamiento univariante

Curvas patrón

1. Curva patrón de AIA (ácido indolacético)
2. Curva patrón de α- CB (α- cetobutirato)
3. Curva patrón de ABS (albúmina sérica bovina)
4. Curva patrón de prolina

Diagramas de cajas y bigotes (Boxplots)

1. AIA
2. ACCD
3. ESF
4. PO_4 solubilizado
5. Porcentaje de solubilización
6. Porcentaje de germinación
7. Longitud de las plántulas
8. índice de vigor
9. Longitud de las plantas en condiciones de invernadero
10. Diámetro del tubérculo
11. Biomasa seca
12. Número de hojas
13. Área del dosel
14. Fv/Fm
15. PIabs
16. Contenido de clorofilas totales
17. Contenido de carotenoides
18. Conductancia estomática
19. CHR
20. Contenido de agua en tubérculo
21. Contenido de agua en hojas
22. Contenido de prolina

Composición de medios de cultivo

1. Medio Czapek
2. Medio Pikovskaya
3. Medio CMC
4. Medio mínimo para actividad ACCD

5. Medio M63 para halófilos

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA: Ácido Indolacético

ACC: Ácido amino-ciclopropano carboxílico

α- CB: α- cetobutirato o ácido α- cetobutírico

ACCD: ACC desaminasa

ESF: Eficiencia solubilizadora de fosfatos

CHR: Contenido hídrico relativo

PVK: Pikovskaya

PDA: Agar Papa Dextrosa

PIabs: Índice de vitalidad de la muestra

Fv/Fm: Eficiencia máxima cuántica potencial del fotosistema II

CMC: Carboximetil-celulosa

g_s: Conductancia estomática

1. RESUMEN

El estrés abiótico por salinidad está asociado con detrimento del crecimiento vegetal, y por lo tanto con la productividad de los cultivos. Por lo que el uso de microorganismos que cuentan con mecanismos fitoestimuladores y de mejoramiento del estado nutricional de las plantas en condiciones de salinidad, surge como una posible solución ante el presente panorama de degradación de los suelos por salinización, debido al exceso de fertilizantes químicos y también como efecto del cambio climático. En la presente investigación se evaluó la potencial actividad de cuatro aislamientos fúngicos halotolerantes en la mitigación del estrés abiótico por salinidad y promoción de crecimiento vegetal en rábano (*Raphanus sativus L.),* a través de mecanismos como la producción de auxinas, solubilización de fosfatos y la actividad ACC desaminasa. Con base en las características morfológicas, y por medio del uso de claves taxonómicas, los hongos se identificaron preliminarmente como: *Aspergillus terreus, Aspergillus fumigatus, Penicillium citrinum* y *Rhodotorula* spp. El estudio constó de tres fases: 1) evaluación *in vitro* de algunos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, 2) evaluación del efecto de la inoculación de los hongos sobre la germinación *In vitro* de semillas de rábano; 3) evaluación del efecto de la inoculación sobre parámetros de crecimiento y fisiología de plantas de rábano bajo condiciones de invernadero, sometidas a salinidad en el agua de riego a 100 y 200 mM de NaCl. Las determinaciones de crecimiento, fluorescencia de la clorofila a, contenido de pigmentos y estado hídrico, se realizaron al final del bioensayo, en el tiempo de cosecha del rábano. Se encontró que, en general, la inoculación de los hongos tiene efectos positivos sobre el crecimiento y variables fisiológicas de las plantas de rábano sometidas a altas concentraciones de NaCl, siendo *P. citrinum* el que tuvo mayor efectividad en cuanto a su impacto positivo sobre las plantas. La mitigación del estrés registrada en plantas de rábano permite concluir que estos hongos o sus metabolitos podrían usarse en la formulación de biofertilizantes aplicables a cultivos sembrados en suelos salinos.

Palabras clave: AIA, ACC desaminasa, fosfato, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*.

2. ABSTRACT

Abiotic stress due to salinity is associated with detriment of plant growth, and therefore with crop productivity. Therefore, the use of microorganisms that have phytostimulatory mechanisms and improve the nutritional status of plants under salinity conditions, emerges as a possible solution to the present scenario of soil degradation by salinization, due to the excess of chemical fertilizers and also as an effect of climate change. In the present investigation, the potential activity of four halotolerant fungal isolates in mitigating abiotic stress and promoting plant growth in radish (*Raphanus sativus* L.) was evaluated through mechanisms such as auxin production, phosphate and potassium solubilization, and ACC deaminase activity. Based on morphological characteristics, and through the use of taxonomic keys, the fungi were preliminarily identified as: *Aspergillus terreus, Aspergillus fumigatus, Penicillium citrinum* and *Rhodotorula* spp. The study consisted of three phases: 1) *in vitro* evaluation of some mechanisms of plant growth promotion; 2) evaluation of the effect of fungal inoculation on the *in vitro* germination of radish seeds; 3) evaluation of the effect of inoculation on growth and physiology parameters of radish plants under greenhouse conditions, subjected to salinity in irrigation water at 100 and 200 mM NaCl. Determinations of growth, chlorophyll a fluorescence, pigment content and water status were made at the end of the bioassay, at the time of radish harvest. It was found that, in general, fungal inoculation has positive effects on the growth and physiology of radish plants subjected to high NaCl concentrations, with *P. citrinum* being the most effective in terms of its positive impact on plants. The stress mitigation recorded in radish plants leads to the conclusion that these fungi or their metabolites could be used in the formulation of biofertilizers applicable to crops grown in saline soils.

Key words: AIA, ACC deaminase, phosphate, *Penicillium, Aspergillus, Rhodotorula.*

3. INTRODUCCIÓN

Las plantas se pueden ver enfrentadas a factores causantes de estrés abiótico tales como inundaciones, déficit hídrico, salinidad, toxicidad por metales pesados, altas y bajas temperaturas, entre otros. El estrés abiótico genera pérdidas en los cultivos debido a una reducción de la tasa de fotosíntesis y se ven comprometidos procesos fisiológicos de la planta como el crecimiento vegetativo, la floración y fructificación (Isayenkov, 2012).

El efecto deletéreo de la alta salinidad sobre las plantas puede evidenciarse en parámetros fisiológicos como pigmentos fotosintéticos, estado hídrico y biomasa (Parihar et al*.,* 2014). Se ha reportado que para las plantas una alta concentración de sales en el suelo se asocia también con estrés por déficit hídrico, estrés oxidativo, toxicidad por iones Na^+ y deficiencia de K^+ (Taiz y Zeiger, 2015).

Por otra parte, ante el panorama de calentamiento global se pronostica que la agricultura será uno de los sectores más perjudicados, dada la sensibilidad de la mayoría de las plantas a condiciones ambientales extremas. Ya que, aunque existen plantas que cuentan con la capacidad de aclimatarse o adaptarse a estados que podrían ser estresantes como el exceso de sales, el cual es el caso de las plantas halófitas, la mayoría no lo son y se conocen como glicófitas (Shilev et al., 2012).

Las principales adaptaciones de las plantas halófitas son la absorción selectiva de iones, sistemas altamente eficientes para la osmorregulación y producción de osmoprotectantes, con el fin de reducir la toxicidad por iones, el estrés osmótico y el daño oxidativo (Yildirim et al., 2008; Parmar et al., 2020).

Adicionalmente, se prevé que el porcentaje de suelos salinos tiende a aumentar debido al cambio climático, ya que un aumento en el nivel del mar por descongelamiento de los casquetes polares puede impactar la composición química de zonas que se encontraban anteriormente fuera del perímetro costero. Por otro lado, el aumento de la temperatura global conduciría a una mayor tasa de evaporación de agua en el suelo, lo cual favorece también la acumulación de sales (Shahid et al., 2018).

El papel de los microorganismos ante este panorama es fundamental, ya que pueden tener efectos positivos sobre la fisiología de las plantas mediante mecanismos directos como la producción de sustancias fitoestimuladoras (giberelinas, citoquininas, auxinas, entre otras); o indirectos, como el mejoramiento del estado nutricional de las plantas a través de los procesos de solubilización de fósforo y de potasio, quelación de hierro y fijación biológica de nitrógeno. Adicionalmente, se ha reportado que algunos microorganismos pueden mitigar el estrés abiótico en plantas, a través de la actividad de la enzima ACC desaminasa y de la producción de osmolitos y antioxidantes para modular los niveles de especies reactivas de oxígeno (Esquivel et al., 2013). Recientemente, estos microorganismos han estado en foco de atención, ya que pueden aumentar la calidad y productividad de los cultivos bajo condiciones ambientales adversas.

Así que el planteamiento del problema del presente estudio se basa en que, los suelos cultivados se encuentran cada vez en un riesgo mayor de deterioro por salinización como resultado de la fertilización química excesiva, irrigación de los cultivos y procesos de desertificación naturales. Dado que la salinidad representa un tipo de estrés abiótico que afecta drásticamente la fisiología de la mayoría de las plantas de interés comercial, se utilizó el rábano (*Raphanus sativus*) como modelo para evaluar el efecto de la inoculación de hongos halotolerantes en cuanto a la mitigación del estrés por salinidad a 100 y 200 mM de NaCl, debido a que el rábano es un cultivo sensible a la salinidad y cuenta con un ciclo de vida rápido (Yildirim et al., 2002; Marcelis y Van 1999).

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Aislamientos fúngicos halotolerantes pueden mitigar el estrés en plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.) sometidas a altas concentraciones de cloruro de sodio (100 mM y 200 mM NaCl)?

5. HIPÓTESIS

Cuatro aislamientos fúngicos halotolerantes obtenidos de la mina de sal de Zipaquirá tienen la capacidad de mitigar el estrés por salinidad en plantas de rábano (*Raphanus*

sativus L.).

6. OBJETIVOS

General:

Determinar el efecto de la inoculación de cuatro aislamientos fúngicos halotolerantes sobre parámetros fisiológicos de crecimiento vegetativo, fluorescencia de la clorofila a, pigmentos y estado hídrico de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.) sometidas a estrés por salinidad.

Específicos:

1. Evaluar *in vitro* la actividad de solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético (AIA) y de la enzima ACC desaminasa de cuatro hongos halotolerantes.
2. Analizar el efecto de la inoculación de los cuatro aislamientos fúngicos sobre la germinación *In vitro* de semillas de rábano en condiciones de salinidad: 0, 100 y 200 mM.
3. Establecer la efectividad de aislamientos fúngicos halotolerantes como mitigadores del estrés en plantas de rábano bajo dos concentraciones de NaCl (100 mM y 200 mM) en condiciones de invernadero.

7. MARCO TEÓRICO

7.1. Hongos halófilos y halotolerantes

Los microorganismos halófilos se pueden encontrar en los tres dominios de la vida. Los hay de tipo aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, quimiótrofos y fototrófos. Se hallan en ambientes como lagos salinos, salares, sedimentos marinos, comida salada y como endófitos de plantas halófitas (Maheshwari et al., 2015), entre otros. De hecho, se han aislado microorganismos halófilos del mar muerto, también, en el gran lago de sal de Estados Unidos, en lagos de soda en África y en minas de sal de Turquía (Ma et al., 2010).

Los microorganismos halófilos hacen parte de la producción de alimentos fermentados como el kimchi coreano, salsa de soya y de miso, y también hacen parte de la producción de quesos, carnes y pescados curados (DasSarma et al., 2010).

Los microorganismos se clasifican como halófilos extremos cuando su rango de sal óptimo para el crecimiento es de 2,5 a 5,2 M; como halófilos moderados aquellos cuyo rango se encuentra entre 0,5 a 2,5 M; y como halotolerantes aquellos que no presentan un requerimiento mínimo de sal, pero que igualmente pueden crecer en concentraciones altas de NaCl (Oren 2002).

De acuerdo con Oren (2010), las posibles aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos halófilos (bacterias, arqueobacterias, algas y hongos) son el uso de sus enzimas en condiciones salinas y la explotación de sus propiedades con fines industriales y comerciales, en cuanto a la obtención de compuestos como exopolisacáridos, b-carotenos, hidroxialcanoatos, ectoina y otros metabolitos secundarios. Además, estos microorganismos se pueden usar en la producción de surfactantes, emulsificadores, proteasas y amilasas para la industria de los detergentes (Maheswari et al., 2015; DasSarma et al., 2010; Gopinath et al., 2005).

Una de las principales ventajas del uso de microorganismos halófilos en la industria biotecnológica, es la reducción del riesgo de contaminación, ya que al ser condiciones específicas de NaCl requeridas para el crecimiento del microorganismo de interés, se reduce la probabilidad de que en el medio crezcan microorganismos diferentes (Yin et al., 2015).

Principalmente, se han estudiado bacterias y arqueobacterias halófilas, como *Halomonas spp., Alteromonas spp., Halobacterium spp., Halococcus spp.* y actinomicetes, debido a su reconocida producción de metabolitos (Maheswari et al., 2015; Hamedi et al., 2012). Sin embargo, dentro de los hongos halófilos, aunque no han sido tan estudiados en comparación con los microorganismos procariotas, también se prevé la existencia de un gran potencial biotecnológico, debido a su producción de amilasas, proteasas, enzimas antioxidantes y compuestos antibacterianos, en condiciones salinas (Ali et al., 2019).

Por otra parte, los principales mecanismos de los hongos halófilos para vivir en altas concentraciones de NaCl son: a) Homeostasis de iones K^+ y Na^+ por medio de canales iónicos y proteínas transportadoras; b) Acumulación de osmolitos compatibles, como aminoácidos libres y alcoholes, tales como glicerol, sorbitol, manitol, ribitol, entre otros; c) Cambios en la fluidez de membrana, lo cual es indispensable teniendo en

cuenta que las células están en ambiente hipertónico, por el exceso de sal (Gunde et al., 2009).

Dentro de los hongos halotolerantes, se encuentran algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, y éstos se consideran una fuente de compuestos bioactivos. Se ha detectado que estos micromicetos pueden producir sustancias antioxidantes, antiinflamatorias y nematicidas, entre otras (Ibrar et al., 2020). Dada la variedad de funciones de los compuestos sintetizados por este tipo de hongos, se consideran de interés biotecnológico, en el contexto agrícola, medicinal e industrial.

Por otra parte, algunos hongos levaduriformes son halófilos, debido a su existencia natural en ambientes hipersalinos. Por ejemplo: *Debaryomyces hansenii, Hortaea werneckii,* y *Wallemia ichthyophaga* (Gunde et al., 2009).

DasSarma et al., (2010) consideran que los hongos *Aspergillus gracilis*, *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus restrictus* y *Sterigmatomyces halophilus* son halófilos estrictos. Además, reportan su aplicación como biorremediadores en suelos contaminados con metales pesados, debido a su capacidad de secuestrar cadmio.

En cuanto a la producción de biofertilizantes, aquellos microorganismos que se encuentran adaptados al ambiente extremo o potencialmente estresante cuentan con mayores probabilidades de mitigar el estrés abiótico en las plantas que se vean expuestas a condiciones de déficit hídrico, salinidad, toxicidad por metales pesados, entre otras (Shirinbayan et al., 2019). Por lo tanto, si se desea producir biofertilizantes que sean aplicables a cultivos que se desarrollan en zonas áridas o semiáridas, en las cuales suele haber suelos con altas concentraciones de NaCl, una buena aproximación es iniciar con la búsqueda de microorganismos halotolerantes o halófilos que cuenten con mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

7.2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal se clasifican en directos e indirectos. Los directos son la biofertilización, mediante el mejoramiento de la disponibilidad de nutrientes y la fitoestimulación, mediante la producción de hormonas

como auxinas, giberelinas, citoquininas, entre otras. Dentro de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal indirectos están: la mitigación del estrés abiótico, la biorremediación de suelos, el control biológico de fitopatógenos, y la inducción de resistencia sistémica (ISR) en plantas mediante la presentación de patrones moleculares (Lubtenber y Kamilova, 2009).

La inoculación de hongos promotores del crecimiento vegetal suele estar asociada a un aumento significativo del porcentaje de germinación, vigor, biomasa, eficiencia fotosintética, floración y productividad (Hossaim et al., 2017).

A continuación, se van a describir algunos de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal mediados por microorganismos, como la producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos y potasio, y producción de sideróforos.

Producción de fitohormonas

Auxinas

La auxinas son cruciales para todos los procesos morfogénicos de las plantas, debido a que señalizan procesos de expansión y división celular, durante la embriogénesis, desarrollo de órganos, floración y desarrollo de frutos. Su señalización está determinada por un gradiente de concentración, el cual se mantiene mediante un balance de los procesos de biosíntesis, acumulación y transporte polar de auxinas (Taiz y Zeiger, 2015; Bonilla 2005). La biosíntesis y transporte de AIA se asocia también a la dominancia apical y, por lo tanto, al fototropismo y gravitropismo de las plantas (Robert et al., 2015). Adicionalmente, las auxinas están relacionadas con la formación de raíces laterales, a pesar de que inhibe la elongación de la raíz principal (Taiz y Zeiger, 2015).

El ácido indol-3- acético es la principal auxina vegetal debido a que es la más abundante, además de ser indispensable para la viabilidad de las plantas, por lo que, en condiciones normales, siempre hay un nivel basal de auxinas en los tejidos vegetales. Sin embargo, en la etapa de senescencia de las plantas esta fitohormona se deja de sintetizar y esto se ha asociado con la caída de hojas (Taiz y Zeiger, 2015).

Las auxinas sintéticas se han utilizado en agricultura hace varios años, y dentro de los usos que se les da están: la prevención de la caída de hojas y frutos, promoción de floración e inducción de partenocarpia, es decir, obtención de frutos sin semillas (Taiz y Zeiger, 2015).

En resumen, el papel de las auxinas se asocia con el elongamiento de tallos y desarrollo de raíces laterales, es por esto que se acepta que los microorganismos productores de esta hormona tienen un papel fitoestimulador y se consideran promotores del crecimiento vegetal.

Giberelinas

Las giberelinas son un grupo grande de hormonas vegetales, se conocen por lo menos 125 de ellas y están definidas por su estructura química, no por su función en el desarrollo vegetal, a diferencia de las auxinas, las cuales son definidas por su actividad biológica. Igualmente, a diferencia de las auxinas, las giberelinas no son estrictamente necesarias para la viabilidad de las plantas (Taiz y Zeiger, 2015).

Las giberelinas están principalmente asociadas con la promoción del crecimiento de los tallos y entrenudos. Además, están involucradas en la promoción de la germinación de semillas y movilización de reservas del endospermo (Taiz y Zeiger, 2015).

Esta hormona fue encontrada por primera vez en 1930 en el hongo *Gibberella fujikuroi*, el cual causaba elongación de los entrenudos de plantas de arroz (Taiz y Zeiger, 2015). En el caso del arroz la presencia del hongo generaba la enfermedad bakanae, que ocasionaba que las plantas se elongaran y alcanzaran una elevada longitud, pero eran delgadas y producían poco.

Por lo tanto, hongos que son productores de giberelinas pueden considerarse de importancia agronómica, por los beneficios en la promoción del crecimiento vegetal, ya que las plantas son más altas. Aunque dependiendo del cultivo puede llegar a ser poco conveniente que las plantas se elonguen demasiado y en esos casos es posible utilizar inhibidores de la síntesis de giberelinas (Taiz y Zeiger, 2015).

Solubilización de P y K

El fósforo es un elemento necesario en la producción de ácidos nucleicos y fosfolípidos, además de hacer parte de todas las reacciones que involucran ATP. El potasio es requerido como cofactor de más de 40 enzimas, y es el principal catión involucrado en el balance hídrico de las células y el mantenimiento de la electroneutralidad celular (Taiz y Zeiger, 2015). Es por esto que, generalmente, se aplican fertilizantes químicos, cuya composición principal se basa en los macronutrientes nitrógeno, fósforo y potasio.

La deficiencia de fósforo en las plantas se evidencia por la inhibición del crecimiento y por la coloración verde oscura o ligeramente púrpura en las hojas, las cuales normalmente se ven malformadas o con manchas necróticas en el borde de las hojas, pero sin clorosis (Taiz y Zeiger, 2015).

Por otra parte, la deficiencia de potasio tiene como primeros síntomas la clorosis en la margen de las hojas y en las venas. Como el potasio se puede movilizar a las hojas jóvenes, los síntomas aparecen principalmente en las hojas más viejas. Además, los tallos se vuelven débiles, con regiones internodales anormalmente cortas (Taiz y Zeiger, 2015).

Es por esto, que los microorganismos que cuentan con la capacidad de solubilizar fósforo y potasio se utilizan en la producción de biofertilizantes, debido a que mejoran la nutrición de las plantas, y con ello se pueden reducir las aplicaciones de fertilizantes de síntesis química.

Las fuentes orgánicas de P incluyen inositol fosfato, ácido fítico y fitina. El proceso de estos complejos orgánicos se conoce como mineralización de P, mediante la enzima fosfatasa. Sin embargo, la fuente común que toman las plantas como nutriente son los iones ortofosfato como H_2PO_4 y HPO_4^{-2}. Así que la cantidad de P en el suelo disponible para las plantas es relativamente baja (Rawat et al., 2020).

Las fuentes inorgánicas e insolubles de P en el suelo son el fosfato tricálcico en los de tipo alcalino; y de aluminio y de hierro, en suelos ácidos (Khan et al., 2014). La

solubilización de fosfato puede ser llevada a cabo mediante la producción de ácidos orgánicos, como ácido cítrico, ácido oxálico y succinato (Rawat et al., 2020). La producción de ácidos orgánicos reduce el pH y por lo tanto aumenta los protones en el medio, lo cual conduce a la liberación de los iones fosfato asociados al calcio, por medio de la propiedad de intercambio catiónico (Khan et al., 2014).

Con relación al potasio, éste es también un nutriente esencial para el desarrollo de las plantas, y normalmente en el suelo se encuentran grandes reservorios de K en forma de minerales como el feldespato potásico, muscovita, ílita, entre otros. No obstante, éstas no son fuentes aprovechables para las plantas, solo el 1 a 2% del K del suelo puede ser tomado por las raíces de las plantas, mientras que el 98% del K está en forma de mica y otros minerales mencionados (Ahmad et al., 2016).

El principal mecanismo de solubilización de K por parte de microorganismos es el de la producción de ácidos orgánicos, pero también puede realizarse por medio de la producción de enzimas y moléculas quelantes (Etesami et al., 2017).

Producción de sideróforos

En plantas, el hierro es un componente importante de enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones, como los citocromos. Los síntomas característicos de la deficiencia de hierro son la clorosis intervenal, la cual aparece primero en las hojas jóvenes, dado que el Fe+ no es movilizado rápidamente de las hojas viejas a las nuevas (Taiz y Zeiger, 2015).

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular, menor a 10kD, las cuales son quelantes de hierro, ya que extracelularmente forman complejos con los iones Fe^{3+} y los transportan hacia las células por medio de receptores de membrana especializados (Niehus et al., 2017). Por un lado, la producción de estas moléculas se asocia con el mejoramiento del estado nutricional de las plantas, en cuanto al nutriente hierro, y por otro lado, se ha reportado que los microorganismos que producen estas moléculas pueden actuar como agentes de control biológico de fitopatógenos mediante competencia por el nicho (Sah et al., 2015).

7.3. Microorganismos en la mitigación del estrés abiótico en plantas

Los microorganismos como mitigadores de estrés abiótico en plantas pueden actuar mediante tres mecanismos: la actividad ACC desaminasa, la quelación de contaminantes, la producción de enzimas antioxidantes, flavonoides, exopolisacáridos y mediante la secreción de metabolitos que señalizan la transcripción de genes de tolerancia al estrés en las plantas (Meena et al., 2017).

ACC Desaminasa (ACCD)

Se ha establecido que el mecanismo de acción de la enzima ACC desaminasa se basa en la competencia con la ACC oxidasa por el sustrato ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), el cual es un compuesto que hace parte del ciclo de síntesis de etileno (Esquivel et al., 2013).

A partir del aminoácido metionina más ATP, se produce SAM (S- adenosilmetionina) por la actividad de SAM sintetasa, en una reacción que se induce en condiciones de senescencia y estrés abiótico. Posteriormente, a partir de SAM por la actividad de la ACC sintasa, se obtiene el ACC. La enzima ACC oxidasa utiliza ACC como sustrato, y produce etileno, dióxido de carbono y ácido cianhídrico; mientras que la enzima ACC desaminasa (ACCD) produce amonio y α-cetobutirato, es por esto que se considera que la actividad de la ACCD tiene un doble beneficio, por un lado, la reducción de los niveles de etileno y por otro el aporte de nitrógeno asimilable para las plantas, en forma de amonio (Esquivel et al., 2013).

Para relacionar la función de la enzima ACC desaminasa de los microorganismos promotores del crecimiento, en la reducción del etileno, primero se debe tener en cuenta los efectos de esta fitohormona.

El etileno es una fitohormona gaseosa que se asocia con la inhibición de la elongación de raíces, promoción de abscisión y senescencia en general. Altos niveles de etileno están relacionados con la degradación de clorofilas, caída de hojas e inhibición de la elongación radicular (Esquivel et al., 2013).

Un ejemplo del uso de hongos como agentes mitigadores del estrés abiótico, específicamente por salinidad, fue reportado por Zhang et al., (2019), quienes realizaron una evaluación de la cepa T6 del hongo *Trichoderma longibrachiatum* como

potenciador de la tolerancia al estrés por salinidad en plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Los autores proponen la actividad de la enzima ACC desaminasa como la ruta de mitigación del estrés abiótico en trigo mediante la inoculación de *T. longibrachiatum*.

7.4. Salinización de los suelos

Un suelo se considera salino cuando contiene al menos 40 mM de NaCl en solución (Bernstein, 2019). De acuerdo con una estimación de la FAO, alrededor del 12% del suelo del planeta se encuentra afectado por salinidad, y el 20% del suelo cultivable se encuentra en algún grado de deterioro por salinización (Parihar et al*.,* 2014). Algunas de las principales causas son la evaporación, las inundaciones, el exceso de fertilizantes químicos y el riego con aguas residuales o agua de mar. Dado que el agua de mar contiene alrededor del 3% de NaCl, lo que equivale a 460 mM (Shahid et al*.*, 2018).

Las causas de la salinización se dividen específicamente en primarias y secundarias. La salinidad primaria hace referencia a la que tiene un origen de tipo natural por acumulación de sales a lo largo del tiempo, lo cual puede obedecer a la presencia de sales solubles en el material parental a partir del cual se formó el suelo, debido a la meteorización de la roca madre, proceso que puede liberar compuestos como cloruro de sodio, sulfatos y carbonatos. Otra causa natural de la salinización primaria es la deposición de sales del agua de mar, debido a su transporte por el viento y caída en forma de lluvia. Este último tipo de sales se conocen como “cíclicas” y son llevadas desde zonas oceánicas hacia áreas continentales por efecto del movimiento del viento (Parihar *et al.,* 2014).

La salinidad secundaria se refiere a la que tiene causas antrópicas. Actividades humanas como la irrigación de cultivos sin suficiente drenaje y exceso de fertilización química, favorecen la acumulación de sales en la rizosfera de las plantas. Otra causa es el uso de agua de riego con alta concentración de NaCl, por ejemplo, aguas residuales (Parihar *et al.*, 2014).

A nivel global, los países que presentan mayores problemas de salinización suelen encontrase en regiones áridas y semiáridas. Los países principalmente afectados por

esta degradación del suelo son India, Pakistán, Siria, Iraq, China y Australia (Qadir et al*.,* 2014).

A nivel nacional, de acuerdo con el mapa de suelos salinizados publicado por el IDEAM (Gobierno de Colombia) en 2017, el 12% del área del país presentaba signos de degradación de suelos por salinización y los departamentos más afectados son: Magdalena, Atlántico, César y la Guajira. Adicionalmente, por lo menos un 45% del área continental del país se encuentra en algún grado de riesgo de presentar problemas de salinización del suelo, debido a causas tanto antrópicas como naturales, relacionadas con la previsión de los efectos del cambio climático.

7.5. Estrés por salinidad en plantas

El estrés por salinidad es considerado uno de los más severos, ya que éste se divide en tres componentes: déficit hídrico, toxicidad por iones y carencia nutricional. La mayoría de las plantas de interés agronómico son sensibles a la salinidad, es decir, son glicófitas, estas plantas no pueden crecer adecuadamente a concentraciones mayores a 100 mM de NaCl, mientras que las plantas halófitas, crecen en salinidad superior a 250 mM (Tuteja, 2007).

De acuerdo con Tuteja (2007), los efectos adversos de la salinidad sobre las plantas son:

1. Efectos hipertónicos sobre las células vegetales. Ya que, la deposición de sales disminuye el potencial hídrico del suelo, es decir, hay menos disponibilidad de agua que puede ser tomada por las raíces de las plantas, a pesar de que la humedad del suelo se encuentre en un buen porcentaje.
2. La salinidad altera la relación K^+/Na^+, ya que en condiciones estresantes hay un aumento del flujo hacia el interior celular del catión Na^+ y un déficit del ión K^+. El exceso de Na^+, superior a 100 mM, es tóxico para las células y puede inhibir la actividad de varias enzimas y se relaciona con el aumento de ROS. Mientras que la deficiencia de K+, interfiere en la regulación de la apertura y cierre de estomas.

En general, el estrés abiótico se traduce en estrés oxidativo por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Dicho aumento y acumulación de ROS ocasiona la peroxidación de lípidos de membrana, oxidación de proteínas y finalmente, la muerte celular (Bernstein, 2019).

Las plantas cuentan con mecanismos de respuesta antioxidante, compuestos por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutation reductasa (GR), entre otros. Igualmente cuentan con mecanismos de respuesta no enzimática que se basa en la producción de compuestos como el glutatión, ácido ascórbico, carotenoides, entre otras moléculas con potencial antioxidante (Bernstein, 2019).

En cuanto al déficit hídrico, las plantas suelen producir y acumular solutos compatibles intracelularmente para evitar la deshidratación y realizar el ajuste osmótico, entre esos solutos se encuentran los azúcares, el aminoácido prolina, glicin-betaína, poliaminas, entre otros (Bernstein, 2019).

7.6. Cultivo de rábano (Raphanus sativus L.)

El rábano (*Raphanus sativus* L.) es una planta de la familia *Brassicaceae* cuya raíz tuberosa es comestible. Dentro de sus propiedades nutricionales están: el contenido de vitaminas A, C y B, y minerales como calcio, magnesio, hierro, fósforo, entre otros. Esta planta tiene uso medicinal principalmente para el tratamiento de enfermedades estomacales y recientemente, ha adquirido importancia como insumo para la producción de biodiesel (Chammoun et al., 2013).

De otro lado, los rábanos rojos (*Raphanus sativus* L.) crecen en cualquier época del año y son plantas herbáceas de ciclo corto, de aproximadamente 5 semanas (Gómez, 2011).

La producción de rábano requiere de suelos con suficiente materia orgánica y el rango de pH óptimo para este cultivo es de 5,5 a 6,8. Además, el cultivo de rábano necesita abundancia y calidad del agua de riego, es decir, con bajos niveles de cloruro de sodio y metales pesados (Casares, 1981; Sousa et al., 2018: Marcelis y Van, 1999).

En Colombia, la producción de rábano se concentra en los departamentos de Cundinamarca y Valle del Cauca, y su cosecha es principalmente aprovechada para alimentación humana (Africano y Pinzón, 2014; Ramírez y Pérez, 2005).

Vale la pena señalar que cuando las plantas de rábano crecen bajo condiciones de estrés por salinidad (NaCl), la actividad fotosintética decrece al igual que el área foliar, así como el contenido de clorofilas, lo cual finalmente representa pérdidas a nivel económico para los productores de esta hortaliza (Jamil et al., 2007; Ayyub et al., 2016; Putti et al., 2014).

Adicionalmente, Sousa et al*.,* (2018) mencionan que existe una relación inversamente proporcional entre el aumento de la salinidad del agua de riego y la disminución en el número de hojas, diámetro de la raíz y altura del tallo en plantas de rábano.

Así que, para la presente investigación, el rábano fue escogido para realizar los bioensayos debido a que se considera un buen modelo biológico, por su ciclo de corto de crecimiento y sensibilidad al estrés por salinidad.

8.MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Descripción e identificación de aislamientos fúngicos

La presente investigación parte del aislamiento de microorganismos halófilos y halotolerantes presentes en muestras de roca halita de la Mina de sal de Zipaquirá Colombia (5°01'10.5"N 74°00'34.1"W) realizado por Romero (2020). Dicho aislamiento se hizo a través del cultivo en el medio selectivo para microorganismos halófilos M63 a tres diferentes concentraciones de NaCl: 0,5M, 2,5 M y 5 M (Otzkur et al., 2015) (Anexo: composición de medios No. 5). Los 4 hongos que se evaluaron en el presente estudio fueron aislados en M63 a 0,5 M. Además, cabe anotar que crecen en condiciones de salinidad 0, por lo que los cuatro hongos se clasificaron como halotolerantes (Oren, 2002).

Posteriormente, para su mantenimiento, los 4 aislamientos fúngicos fueron sembrados en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) y se mantuvieron en incubación a 24°C, realizando repiques semanales mediante la técnica de punción, recurriendo al uso de asas rectas y mecheros de gas.

Mediante el uso de distintas claves taxonómicas (Membrillera, 1950; Kurtzman et al., 2011; Membrillera 1951), se logró hacer una identificación preliminar de los 4 aislamientos fúngicos con base en las características macroscópicas y microscópicas de las colonias. Para la observación microscópica se realizó tinción de las muestras con azul de lactofenol, en microscopio óptico (Leica, Alemania) con objetivo 40 X.

8.2. Prueba de halotolerancia:

Para confirmar la halotolerancia de los 4 aislamientos, se llevó a cabo una siembra por triplicado en medio Czapek (Pazouki et al., 2005) modificado con NaCl, a 100 mM y 200 mM, ya que a estas concentraciones de sal se realizaron también los ensayos de germinación *in vitro* y el bioensayo en invernadero con las plantas de rábano. Para esto la equivalencia de molaridad en otras unidades de medida de concentración es:

100 mM= 0,585% p/v ó 5,85 g de NaCl/L

200 mM= 1,17% p/v ó 11,7 g NaCl/L

8.3. Fase I: Ensayos *in vitro*

a) Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfatos de aislamientos fúngicos halotolerantes

Se realizó la evaluación de la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico, específicamente, fosfato tricálcico $Ca_3(PO_4)_2$ (Cisneros, 2015) Los hongos fueron sembrados por punción en agar Pikovskaya (PVK), cuya composición se encuentra en la sección de anexos (Anexos: composición de medios No. 1) Pasados tres días desde la siembra para cada aislamiento se midieron los diámetros de la colonia junto con el halo de solubilización (A) y de la colonia sola (B) para aplicar la fórmula de eficiencia solubilizadora de fosfatos (ESF), con la siguiente fórmula (Cisneros y Sánchez de P., 2015):

$$ESF = \frac{A}{B}$$

Método cuantitativo:

Para cuantificar el fosfato solubilizado por los hongos, éstos fueron sembrados en 20 mL de medio PVK líquido con fosfato tricálcico como fuente de P y se llevaron a incubación en agitación durante siete días, a 28°C y 150 rpm. A continuación, se utilizó la prueba de fosfatos Spectroquant 114842, (Merck Millipore), el cual permite determinar ortofosfatos entre 1,5 – 92,0 µg/mL PO_4^{3-}. Para esto, pasados los siete días de incubación de los hongos, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos, y del sobrenadante se tomaron 5 mL para añadirle 1,25 mL del reactivo de la prueba Spectroquant. Se dejó un minuto en reposo y luego se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 410 nm. La presencia de ortofosfatos se evidencia por la aparición de un color amarillo anaranjado luego de agregar el reactivo del kit. Por último, de acuerdo con el documento "*Programming Data for Spectroquant® Test Kits: Calibration Information: wavelength, slope and blank value*", el cual es suministrado por el fabricante para el uso del kit, las absorbancias obtenidas se multiplican por el factor correspondiente para obtener los resultados en µg/mL de PO_4 (Ver anexos: Tabla B).

Una vez obtenidos los valores de µg/mL de PO_4 solubilizado, se calculó el porcentaje de solubilización, el cual tiene en cuenta la concentración de fosfato inorgánico inicial con el que se preparó el medio, de la siguiente forma (Moreno et al., 2021):

$$\%\ de\ solubilización = \frac{PO4\ solubilizado}{PO4\ inicial\ en\ el\ medio} * 100$$

b) Evaluación de la producción de ácido indolacético (AIA):

Por tratarse de un método colorimétrico, se inició con la preparación de la curva patrón de ácido indolacético (AIA). Para esto se preparó el reactivo de Salkowsky utilizando $FeCl_3$ a una concentración de 12g/L disuelto en H_2SO_4 a 7,9M. Además, la solución stock de AIA para la curva patrón, se realizó con AIA (Indole-3-acetic acid, Sigma-Aldrich) disuelto en etanol, a una concentración de 100 µg/mL (Asif et al., 2018). Posteriormente, se realizaron las diluciones correspondientes para obtener concentraciones entre 10 a 90 µg/mL de AIA. A 1mL de solución patrón de cada concentración de AIA, se le agregaron 2mL del reactivo de Salkowsky, se dejó en

oscuridad 1 hora, y luego se leyó la absorbancia a 530 nm. De esta forma se obtuvo la ecuación de la recta, con un R^2 de 0,9892 (Ver Anexos: Curva 1).

A continuación, se llevó a cabo la cuantificación de ácido indolacético producido por los 4 hongos, por triplicado. Para esto, los hongos fueron sembrados en 20 mL de medio líquido Czapek adicionado con L-triptófano (0,5mg/mL) (Vinod et al., 2017). Posteriormente, se dejaron 3 días en incubación a 28°C y agitación a 120 rpm.

Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y se tomó 1mL del sobrenadante, a este último se le agregaron 2 mL del reactivo de Salkowsky. Seguido, se dejaron las muestras en reposo durante 1 hora en oscuridad para que tuviera lugar la reacción de oxidación de compuestos indólicos, lo cual genera un cambio de color de amarillo a rojizo. Pasado dicho tiempo, se leyó en espectrofotómetro a 530 nm, utilizando como blanco 1mL de agua destilada más 2mL del reactivo de Salkowsky.

Posteriormente, con la ecuación de la curva de calibración elaborada con concentraciones conocidas de ácido indolacético, se realizó una interpolación para calcular la cantidad de AIA producido en µg/mL.

c) Evaluación de la actividad de la enzima ACC desaminasa

Para evaluar la actividad ACC desaminasa se siguió la metodología descrita por Penrose y Glick (2003). La cual se basa en el uso de ACC por parte de los hongos como única fuente de nitrógeno en el medio, cuyo uso genera amoníaco (NH_3) y ácido α -cetobutírico; este último es el que se cuantifica, a través del método colorimétrico por la reacción que tiene lugar al añadir 2,4-dinitrofenilhidrazina, lo que ocasiona la formación de fenilhidrazona. Posteriormente se adiciona NaOH 2N que permite observar la coloración de la fenilhidrazona.

Por lo que el primer paso fue realizar la curva patrón con concentraciones conocidas de ácido α -cetobutírico, cuya solución Stock se preparó a 10mM de α -cetobutírico disuelto en 0,1 M de Tris-HCl a pH 8,5; teniendo en cuenta que el Tris se diluyó en agua y se utilizó el HCl para ajustar el pH. Dicha solución se mantuvo refrigerada a 4°C hasta su uso. A partir de la solución stock se realizaron las diluciones entre 0,1 y

1 µM. Seguido, se tomaron 0,2 mL de cada concentración de la solución patrón y 0,3 mL de 2,4- dinitrofenilhidrazina a una concentración de 2 g/L (utilizando como solvente HCl 2M). Se pasó por vórtex y luego se incubaron las muestras a 30°C durante 30 minutos, para luego añadirle 2mL de NaOH 2N, pasarse de nuevo por vórtex y leer la absorbancia a 540 nm. Luego de obtener los datos de absorbancia y graficar la curva Abs 540 Vs µM de ácido α -cetobutírico, se obtuvo la ecuación de la recta con un R^2 de 0,9928 (Ver anexos: Curva 2).

Posteriormente, por triplicado, los 4 hongos fueron sembrados en 20 mL de medio líquido sintético (Yedidia et al., 1999) y se incubaron durante 5 días en agitación, a 28°C y 180 rpm. Pasado el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron 5 minutos a 10000 rpm, se removió el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 2mL de Tris 0,1 M pH 7,6, disuelto en agua (HCl se utilizó para ajustar el pH). Luego, se centrifugó nuevamente durante 5 minutos, y se descartó el sobrenadante, para a continuación resuspender el pellet en 2 mL de Tris 0,1 M pH 8,5. Seguido, se agregaron 30 µL de tolueno y la muestra se llevó a vortex durante 30 segundos. En este punto la muestra se dividió en dos, 1 mL para continuar con el proceso de determinación de la cantidad de ácido α -cetobutírico producido, y 1 mL para realizar posteriormente la cuantificación de proteínas totales.

Del mililitro de muestra toluenizada que se conservó para la actividad enzimática, se tomaron 0,2 mL y se les agregaron 20 µL de ACC 0,5 M, la mezcla se pasó por vórtex y luego se incubaron a 30°C durante 15 minutos. Pasado ese tiempo se agregó 1mL de HCl 0,56M, para luego centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó 1 mL de sobrenadante para añadirle 0,8 mL de HCl 0,56M, y pasarlo por vortéx. De esta mezcla se tomaron 0,2 mL y se procedió a agregarle 0,3 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2g/L en 2M de HCl), pasar por vórtex y luego incubar a 30°C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo se agregó a cada una de las muestras 2mL de NaOH 2N, y se midió la absorbancia a 540 nm, utilizando como blanco el medio sintético que contiene ACC y los demás reactivos utilizados.

Adicionalmente, como se trata de actividad enzimática, era necesario realizar la cuantificación de proteínas totales (Melgarejo et al., 2010), procedimiento que se llevó a cabo por medio del método de Bradford utilizando como colorante azul de Comassie

G-250, y albúmina de Suero Bovino (BSA) como patrón para construir la curva de calibración a partir de una solución stock de 1,45mg/mL. Las diluciones se realizaron en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,8. Luego, a cada una de las soluciones patrón de BSA se les añadió 0,8 mL de reactivo de Bradford, se dejaron en reposo durante 15 minutos y pasado el tiempo se leyó absorbancia a 450 nm y 590 nm de cada una de las muestras, usando como blanco el buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,8. A partir de los datos de la curva patrón de ABS se obtuvo la gráfica absorbancia 590/450 Vs µg/mL de proteína, con su respectiva ecuación de la recta (Ver anexo: curva 3).

El reactivo de Bradford se preparó utilizando el reactivo Brilliant Blue disuelto en etanol al 95%, en oscuridad se le agregó ácido fosfórico al 85% y la mezcla se filtró 2 veces utilizando filtros de papel. Este reactivo se conservó en frasco ámbar a 4°C. Adicionalmente, los buffers de la curva patrón pH 6,8 y el buffer de extracción pH 7,5, también fueron preparados para realizar esta determinación de contenido de proteínas de acuerdo con la metodología expuesta por Melgarejo et al., (2010).

A partir del mililitro restante de muestras toluenizadas, se tomaron 0,5 mL de cada muestra y se les agregó 5 mL de buffer fosfato de potasio pH 7,5, se pasó por vortex durante 2 minutos, para luego incubar las muestras durante 1 hora en cama de hielo con agitación horizontal. Por último, fueron centrifugadas durante 30 minutos a 6000 rpm y 4°C, se recuperó el sobrenadante, de éste se tomaron 0,2 mL para agregarle 0,8 mL del reactivo de Bradford, se dejó la mezcla en reposo durante 15 minutos y luego se leyó la absorbancia a 450 y 590 nm, para interpolar los resultados en la curva de calibración.

d) Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica

Esta actividad se evaluó de forma complementaria, posteriormente al ensayo de germinación, con el objetivo de determinar si la degradación de la celulosa por parte de los hongos estaba relacionada con un aumento de la germinación, por un tipo de escarificación biológica, o si por el contrario, se asociaba más con una disminución en la germinación por el uso de los recursos nutricionales de la semilla por parte de los hongos, teniendo en cuenta que el medio de germinación de las semillas carecía de nutrientes adicionales para el crecimiento de los hongos. Para evaluarlo, los hongos se sembraron por triplicado en agar CMC (carboximetilcelulosa), con ésta

como única fuente de carbono. Los cultivos se incubaron a 28°C y se realizó la lectura a los 3 días. El crecimiento de los hongos sobre este medio se tomó como resultado positivo para la degradación de la celulosa y se midió el diámetro de la colonia (Teather y Wood, 1982).

8.4. Fase II: Efectos sobre la germinación *in vitro*

a) Preparación y aplicación de inóculos:

El primer paso para evaluar el efecto de los hongos sobre la germinación de semillas de rábano fue la preparación de los inóculos fúngicos. Los inóculos consistían en suspensiones de esporas de los hongos miceliales en agua destilada estéril; mientras que, para el caso de la levadura, se tomó en cuenta el número de blastoconidias o células levaduriformes. El ajuste de la concentración a 10^6 esporas/mL se realizó por conteo de esporas y blastoconidias utilizando la cámara de Neubauer (Mujica y Sales, 2013). Las esporas de los hongos de géneros *Aspergillus* y *Penicillium* suelen ser hidrofóbicas, por lo que, para lograr una adecuada suspensión y evitar aglomeraciones, la preparación se realizó en agua destilada con Tween 20 al 1%, para los 4 hongos y controles, y se utilizó inmediatamente para inocular las semillas (Aberkane et al., 2002).

b) Determinación de porcentaje de germinación, longitud y vigor

Un total de 1800 semillas de rábano fueron desinfectadas dejándolas en inmersión en hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos, y luego se lavaron muy bien varias veces con agua destilada estéril (Azis, 2016). Se utilizaron 100 semillas por cada tratamiento, los cuales fueron 18 en total. Estos 18 tratamientos se dividen según dos categorías: la primera, 3 grupos de acuerdo con la salinidad: 0, 100 y 200 mM de NaCl en el agua de solución aplicada para la imbibición de las semillas; la segunda, 6 grupos de acuerdo con el hongo con el cual fueron inoculadas las semillas: *Rhodotorula* spp., *A. terreus*, *A. fumigatus*, *P. citrinum*, el conjunto de todos los hongos, y las semillas control las cuales no fueron inoculadas.

Posteriormente, las semillas se dejaron durante tres horas sumergidas en 5 mL del inóculo de cada hongo: *Rhodotorula* spp, A*. terreus, A. fumigatus, P. citrinum*, el conjunto de todos los hongos, y aquellas del grupo control sin hongo, en 5mL de agua destilada con Tween 20 al 1%. Al pasar las tres horas, las semillas se pusieron en

cajas de Petri con agua destilada sin NaCl, y adicionada con 100 y 200 mM de NaCl, dependiendo del tratamiento de sal. Así se mantuvieron en oscuridad durante 10 días y diariamente y bajo luz de seguridad se fue registrando el número de semillas germinadas. En el día 10 se midió la longitud total que habían alcanzado las plántulas, incluyendo tanto el hipocótilo como el epicótilo, para calcular el índice de vigor por medio de la siguiente fórmula (VI) (Vashisth y Nagarajan, 2010):

$$VI = \%\ de\ germinación * promedio\ de\ longitud\ total\ de\ la\ plántulas$$

Luego de medirles la longitud, estas plántulas se descartaron, ya que el rábano es una planta de siembra directa, así que, para la siguiente etapa de crecimiento en invernadero, se partió desde semilla realizando nuevamente los procesos de desinfección, preparación de inóculos e inoculación tal y como se describió para el ensayo de efecto sobre la germinación.

7.7. Fase III: Efectos sobre el crecimiento vegetativo y fisiología

7.7.1. Montaje del bioensayo en condiciones de invernadero

El diseño experimental contó con 10 plantas por cada tratamiento, los cuales eran 18 en total, así que se pusieron a crecer 180 plantas de rábano bajo condiciones de invernadero. Los 18 tratamientos se dividen según dos categorías: primera, 3 grupos de acuerdo con la salinidad aplicada: 0,100 y 200 mM de NaCl en el agua de riego; segunda, 6 grupos de acuerdo con el hongo con el cual fueron inoculadas las semillas: *Rhodotorula* spp., *A. terreus*, *A. fumigatus*, *P. citrinum*, Conjunto de todos los hongos, y semillas que no fueron inoculadas.

Para esto, el sustrato de crecimiento de las plantas se esterilizó en autoclave dos veces, cada ciclo de una hora. Dicho sustrato fue de suelo mezclado con arena cuarcítica. Las plantas se sembraron partiendo de semillas, y se siguió el procedimiento de desinfección y de inoculación como se describió para el ensayo de germinación, es decir, antes de sembrar se desinfectaron 180 semillas y se inocularon con los respectivos tratamientos de hongos y controles, durante 3 horas.

Las semillas se sembraron en macetas de 14 cm de diámetro por 10 cm de alto. En condiciones de invernadero, la temperatura durante los dos meses de crecimiento de

las plantas osciló entre 14, 8°C a 19°C, y la humedad relativa entre 79 a 81 %, estos datos fueron tomados con un termohigrómetro digital (Xiaomi). Con fotoperiodo normal 12h/luz, 12h/oscuridad.

El riego se realizó cada tres días y el agua que se utilizó para los diferentes tratamientos (0mM, 100mM y 200mM) era agua bidestilada fría. La sal que se utilizó para preparar el agua de riego era sal marina (NaCl) sin yodo ni otros aditivos.

Todas las mediciones de variables de crecimiento, fluorescencia de la clorofila a, pigmentos (clorofilas y carotenoides), y estado hídrico se tomaron al final del experimento (pasados dos meses desde el inicio del tratamiento de salinidad en el agua de riego). De las 180 plantas, en total 60 por cada tratamiento de salinidad 0, 100 y 200 Mm. Del total de 180 plantas, 90 se utilizaron para determinar las variables que requerían de muestreo destructivo de la planta completa, como lo son la suma de la biomasa seca de raíz y vástago, área foliar y longitud radicular. Las 90 plantas restantes se utilizaron para realizar primero las mediciones de muestreo no destructivo, como fluorescencia de la clorofila a y conductancia estomática; y posteriormente se usaron sus hojas para la determinación de pigmentos vegetales y prolina como se detalla a continuación.

7.7.2. Evaluación de las variables de crecimiento y fisiología

a) Longitud total radicular y diámetro máximo del tubérculo:

Se midió la longitud radicular con la ayuda de una cinta métrica y con un calibrador digital se midió el diámetro máximo del tubérculo (parte comestible de la planta de rábano, engrosamiento globoso de la raíz de color rojo y pulpa blanca).

b) Número de hojas y área foliar:

Se realizó el conteo del número de hojas y se tomaron fotos de cada una de las ellas sobre un papel blanco con una escala de referencia en cm, para luego pasar las imágenes por el software image J (Version 153, 2015) para calcular el área foliar en mm^2, y con la suma de las áreas de las hojas obtener el área del dosel de cada planta.

c) Biomasa seca:

Las respectivas plantas se pesaron en una balanza analítica cuando estaban frescas, luego se empacaron en sobres de papel periódico, separando órganos: raíz, tallo y hojas, luego se llevaron a una estufa de aire circulante durante 24 horas a 72°C, para luego pesarlas y registrar el peso seco (Melgarejo et al, 2010).

d) Fluorescencia de la clorofila a

Con un fluorómetro no modulado (Pocket PEA, Hansatech, Inglaterra) se midió la fluorescencia de la clorofila a en la parte media de tres hojas de cada planta, sin tomar la vena principal, en el prealba (entre 3 y 5 am). A las plantas adaptadas a oscuridad durante la noche se les colocó clips durante 30 minutos para la respectiva medición. Se utilizó luz roja pulso de saturación a 3000 µmol fotones m^{-2} s^{-1} por un segundo. Luego por medio del software PeaPlus 1.0.0.1, se obtuvieron los datos de rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm) y el índice de vitalidad de la muestra PI_{ABS}.

e) Pigmentos foliares: clorofilas totales y carotenoides

Se tomaron tres hojas de cada planta del respectivo tratamiento. Todo el proceso se realizó bajo condiciones de baja luminosidad, para evitar la degradación de los pigmentos. Las hojas se cortaron en trozos pequeños omitiendo la nervadura principal, para macerarlos en un mortero sobre cama de hielo mientras se adicionaba nitrógeno líquido, hasta lograr un polvo fino. Una vez obtenido el polvo, este se pesó para utilizar aproximadamente 0,1 g, el peso exacto utilizado para la determinación fue registrado para los cálculos finales. Luego, en tubos Ependorff a cada muestra se le agregó 1 mL de acetona al 80% (V/V) y se llevó a centrifugación a 10000 rpm a 4°C durante 3 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se guardó en un frasco ámbar. El pellet se resuspendió en acetona y nuevamente se llevó a centrifugación, como se describió anteriormente, y el sobrenadante se sumó al anterior. Este procedimiento se repitió hasta que el pellet obtenido ya no tuviera ningún tono verde, lo cual tomó aproximadamente 6 a 8 repeticiones. El sobrenadante obtenido de los lavados secuenciales se completó hasta 10 mL con acetona; para luego leer las absorbancias a tres longitudes de onda: 663 nm, 647 nm y 470 nm, utilizando como blanco analítico acetona al 80% v/v (Melgarejo et al, 2010). Posteriormente, con los valores de absorbancia, peso del material vegetal y volumen final de sobrenadante, se aplicaron

las siguientes ecuaciones para obtener la concentración de clorofilas y carotenoides (Lichtenthaler, 1987 en Melgarejo et al., 2010):

$$clorofila\ total = (7{,}15 * A663\ nm) + (18{,}7 * A647\ nm)$$

$$clorofila\ a = (12{,}25 * A663\ nm) - (2{,}79 * A647\ nm)$$

$$clorofila\ b = (21{,}5 * A647\ nm) - (5{,}1 * A663\ nm)$$

$$Carotenoides = \frac{(1000 * A470nm) - (1{,}82 * clorofila\ a) - (85{,}02 * clorofila\ b)}{198}$$

f) Conductancia estomática

El muestreo se llevó a cabo utilizando el porómetro (Decagon devices, Estados Unidos), tomando tres hojas del tercio medio de cada planta. La pinza del porómetro se ubicó en el tercio medio de cada hoja, evitando la nervadura principal. Las medidas de conductancia estomática se realizaron entre las 8 y 11 am.

g) Contenido de agua en órganos:

A partir de los datos de peso fresco y seco de los órganos vegetales por separado, se determinó el contenido de agua en órganos, específicamente se tuvo en cuenta el contenido de agua en tubérculo y hojas, por medio de la diferencia entre el peso fresco y el peso seco.

h) CHR en discos foliares

Se tomaron 3 hojas de cada planta y se le realizaron cortes con un sacabocados redondo de 2 cm de diámetro. De cada hoja se sacaron 10 discos. Estos discos se pesaron para obtener el peso fresco, luego se llevaron a saturación en agua destilada dentro de cajas de Petri en oscuridad por dos horas a peso constante, pasado ese tiempo se registró el peso a plena turgencia. Luego, los discos se envolvieron en papel periódico y se llevaron a estufa a 70°C durante 24 horas para tomar el peso seco. Por último, se aplicó la siguiente fórmula para determinar el CHR (Melgarejo et al., 2010).

$$CHR = \frac{mf - ms}{mt - ms} * 100$$

Donde *mf:* masa fresa, *mt*: masa a plena turgencia, *ms:* masa seca.

i) Contenido de prolina

La determinación del contenido de prolina se realizó con base en lo descrito por Bates et al, (1973) y Melgarejo et al (2010). Se tomaron datos para la curva de calibración con concentraciones conocidas de prolina. Para lo cual a partir de una solución stock de prolina a 40 µM se realizaron 7 diluciones utilizando ácido sulfo-salicílico al 3% (p/v) como solvente. A cada una de las soluciones patrón en tubos de ensayo, se les agregó 1mL de ninhidrina y 1mL de ácido acético glacial tibio, la mezcla se agitó en vórtex por 15 segundos. Luego, las muestras se incubaron durante una hora a ebullición en baño maría. Pasado ese tiempo se realizó un enfriamiento rápido poniendo los tubos sobre una cama de hielo. Se adicionaron 3mL de tolueno y se pasaron las muestras por vórtex durante 20 segundos, luego las muestras se dejaron reposar en oscuridad durante 1 hora. Por último, se colectó la fase superior de cada tubo y se leyó la absorbancia a 520 nm. Con los datos obtenidos se realizó la gráfica de Abs 520 vs prolina (µM).

Luego de tener la curva de calibración, las muestras se procesaron de la siguiente forma: primero, se tomaron tres hojas por planta, se cortaron en trozos y se maceraron en mortero en cama de hielo y se le adicionó nitrógeno líquido para obtener un polvo fino. Se registró el peso de la muestra, el cual era de aproximadamente 0,1 g. A cada muestra, en tubos falcon de 15 mL cubiertos de papel aluminio, se les agregó 5 mL de ácido sulfosalicílico, 3% (p/v). Luego las muestras se pusieron en agitación horizontal durante 1 hora. Pasado ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm, durante 30 minutos a 10°C. Se tomó 1mL del sobrenadante y se le adicionó 1mL de ninhidrina y 1 mL de ácido acético glacial tibio, la mezcla se tapó y se agitó vigorosamente con vórtex. Después, las muestras se pusieron en baño maría a ebullición durante una hora, pasado el tiempo se enfrío bruscamente sobre cama de hielo. Luego, se les añadió 3 mL de tolueno y se llevó a vórtex, durante 60 s. Finalmente, se colectó la fase superior y se leyó la absorbancia a 520 nm, usando tolueno como blanco analítico.

8.6. Tratamiento estadístico de los datos:

8.6.1. Univariante

Para el tratamiento estadístico univariante, primero se realizaron las tablas de resumen, teniendo en cuenta el promedio y la desviación estándar para la etapa descriptiva univariante. Luego, las diferencias significativas se determinaron utilizando ANOVA paramétrico a una vía y test de Tukey como post-hoc, solo en los casos donde se cumplía con las condiciones de normalidad y homocedasticidad. La normalidad se probó por medio de la prueba de Shapiro y la homocedasticidad a través de la prueba de Levene. En los casos donde no se cumplían las condiciones, se realizaron pruebas no paramétricas: test de Kruskall- Wallis y test de Mann-Whitney-Wilcoxon como prueba post-Hoc. Siempre utilizando un nivel de confianza del 95% ($p<0,05$). En anexos (Tabla C) se puede revisar para cuáles grupos se usaron las pruebas paramétricas y para cuáles las no paramétricas.

8.6.2. Análisis multivariante

La segunda parte del análisis estadístico fue de tipo multivariante, utilizando los resultados obtenidos para las 14 variables de crecimiento y fisiología, primero se obtuvo la matriz de correlaciones para saber cuáles variables están altamente relacionadas entre sí. Luego, se realizó un análisis de componentes principales y un análisis de clúster o de agrupación, para saber si las plantas de cada grupo definido en el muestreo se mantuvieron agrupados al utilizar como criterio de estructuración su desempeño en las diferentes variables.

Todos los análisis se realizaron en el software R versión 4.2.1.

9.RESULTADOS

Identificación preliminar de aislamientos fúngicos

1. *Penicillium citrinum*

Descripción macroscópica: En medio PDA, luego de 7 días a 24°C se observa crecimiento radial. Colonias de aspecto aterciopelado, no algodonoso. El reverso es de color amarillo. En colonias maduras se observa la producción de exudados fúngicos de color amarillo (Ver figura 1).

Descripción microscópica: Hongo micelial de hifas septadas, cuyas conidias son esféricas y tienen un tamaño entre 2-3 micrómetros, mientras que el tamaño de las fiálides es de 7 a 9 micrómetros. Los conidias son de pared delgada y sin anillo en la base. Los conidias no se encuentran rodeados de mucílago ni en conformaciones, sino de forma independiente. No presenta peritecios, el micelio no presenta hifas aéreas que se retuersan para formar cuerdas, es decir, son no funiculosas. Los penicilios son biverticilados y los conidióforos no presentan ensanchamiento en el ápice. Conidiofóros y conidios tienen paredes lisas (Membrillera, 1950).

2. Aspergillus terreus

Descripción macroscópica: En medio PDA, tras 7 días de crecimiento a 24°C, se observan colonias de aspecto blanquecino con puntas negras. Micelio algodonoso de crecimiento radial. Colonias flocosas con abundantes hifas aéreas. Reverso puede ser de color blanco o crema dependiendo de la etapa de crecimiento (Ver figura 1).

Descripción microscópica: Cabezuelas conidiales típicas del género, con vesícula globosa, de 20 a 30 micras de diámetro. Cabezas conidiales columnares. No presenta peritecios. Conidios lisos hialinos de pared delgada, globosos y abundantes, de 2 a 2,5 micras de diámetro (Membrillera, 1951).

3*. Aspergillus fumigatus*

Descripción macroscópica: Colonias aterciopeladas y polvosas de color verde oscuro a café, con poca elevación, no flocosas. Colonias inicialmente blancas y luego se tornan verde. Reverso amarillento (Ver figura 1).

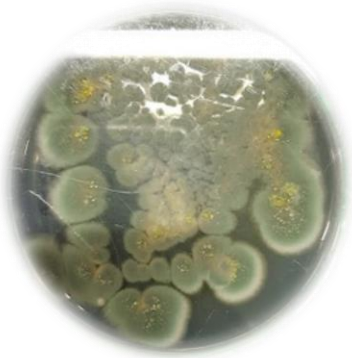
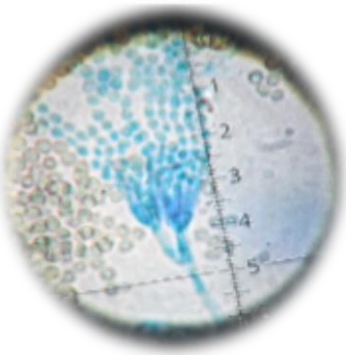
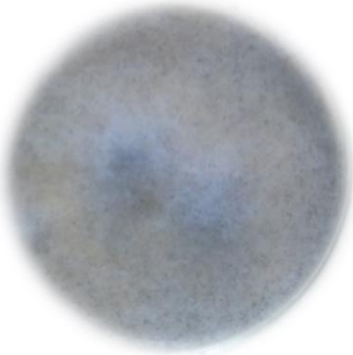
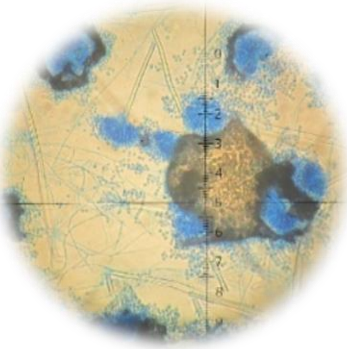
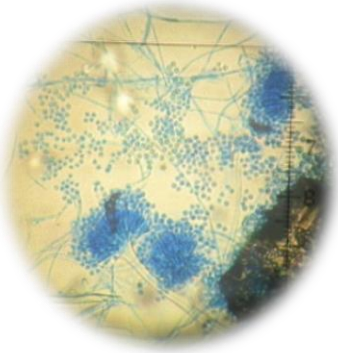
Descripción microscópica: Hifas septadas. Cabezas conidiales compactas. Las fiálides se organizan de forma columnar y no radiada, cubriendo solo la tercera parte de la vesícula. Conidios globosos, de paredes lisas, de 2 a 3 micrómetros de diámetro. Sin cleistotecios (Membrillera, 1951).

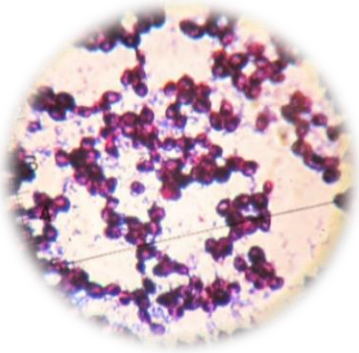
4*. Rhodotorula spp.*

Descripción macroscópica: En PDA a 24°C, se observa crecimiento levaduriforme pigmentado de color rosado o coral, con aspecto mucilaginoso y brillante y margen entera (Ver figura 1).

Descripción microscópica: Cuerpo levaduriforme o blastoconidia de 4 micras, de forma ovoide. No presenta pseudohifas. (Kurtzman et al., 2011).

Figura 1. Crecimiento en medio PDA, luego de 7 días de siembra. a)*Penicillium citrinum*, b)*Aspergillus terreus*, c)*Aspergillus fumigatus*, d)*Rhodotorula* spp.

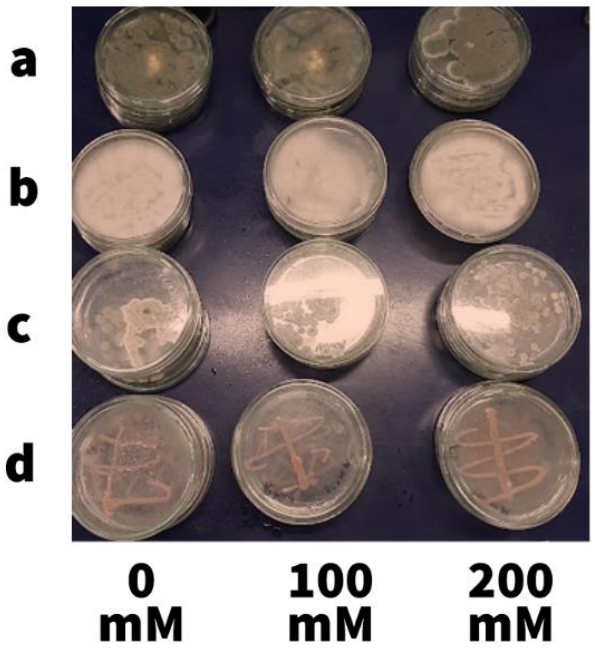
	1.Vista macroscópica	2.Vista microscópica (40X)
a		
b		
c		

d		

Prueba de halotolerancia

Los cuatro aislamientos fúngicos evaluados: *A. terreus, A. fumigatus, P. citrinum y Rhodotorula* spp. se consideran halotolerantes, ya que se comprobó que pueden crecer en medio Czapek sin NaCl, pero también crecen en condiciones de 100 y 200 mM de cloruro de sodio, como se puede observar en la Figura 2.

Figura 2. Prueba de halotolerancia. Crecimiento en medio Czapek modificado con 100 y 200 mM de NaCl*. a) Penicillium citrinum, b) Aspergillus terreus, c) Aspergillus fumigatus, d) Rhodotorula* spp



FASE I: MECANISMOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL IN *VITRO*

Como se observa en la tabla 1, los dos hongos del género *Aspergillus* no produjeron ácido indolacético, mientras que *Rhodotorula* spp. y *P. citrinum* sí. *Rhodotorula* spp. produjo significativamente más AIA, que el hongo del género *Penicillium.*

Tabla 1. Evaluación *in vitro* de algunos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. De izquierda a derecha: Eficiencia solubilizadora de fosfato (ESF), -PO_4 solubilizado, porcentaje de solubilización, actividad ACC desaminasa, producción de ácido indolacético (AIA).

Hongo	ESF	PO_4 (µg*mL^{-1})	%Solubilización	ACC des (nmol αCB *mg^{-1}*h^{-1})	AIA (µg*mL^{-1})
Rhodotorula spp.	2,217±0,202 (a)	56,782±0,323(a)	11,356±0,065(a)	9,161±0,626 (a)	88,04±0,615 (a)
A. fumigatus	1,387±0,068 (b)	53,305±0,278(b)	10,661±0,056(b)	9,429±0,471(a)	0,000
A. terreus	1,043±0,016 (c)	49,586±0,643(c)	9,917±0,129(c)	50,96±1,380(b)	0,000
P. citrinum	2,074±0,128 (a)	53,763±1,056(b)	10,753±0,211(b)	31,38±2,191(c)	39,21±0,572 (b)

Con respecto a la solubilización de fosfatos, se obtuvieron tres variables: ESF (eficiencia solubilizadora de fosfatos), PO_4 (µg/mL) y porcentaje o eficiencia de solubilización en medio PVK. Se puede observar que *Rhodotorula* spp cuenta con el mejor desempeño en las tres variables mencionadas, por lo que se puede decir que, de los cuatro aislamientos evaluados, tuvo la mejor actividad de solubilización de fosfatos, seguida por *P. citrinum* y *A. fumigatus* ya que estos dos no presentan diferencias significativas en las variables de PO_4 solubilizado ni en porcentaje de solubilización. En último lugar de desempeño en términos de solubilización de fosfato se encuentra para el aislamiento *A. terreus.* Los cuatro hongos son solubilizadores de

fosfatos, probablemente por producción de ácidos orgánicos ya que luego de 3 días de ser sembrados en medio líquido PVK a pH de 6,8 todos redujeron el pH del medio hasta 2 (Ver anexo, Tabla A).

Con respecto a la actividad ACC desaminasa, los cuatro hongos cuentan con esta actividad enzimática que está asociada con la reducción de los niveles de etileno y por lo tanto se reconoce como una actividad que está asociada con la mitigación de estrés abiótico. Ésta se mide en términos del ácido α-cetobutírico, o también llamado α-cetobutirato (α-CB), que se produce cuando la enzima ACC desaminasa cliva las moléculas de ácido aminociclopropano carboxílico (ACC). De acuerdo con Penrose and Glick (2003) se considera una actividad enzimática baja por debajo de los 20 nmol de α-CB*mg de proteína^{-1}*hora^{-1}, por lo que los hongos *Rhodotorula* spp y *A. fumigatus* son los que menor desempeño tienen en esta variable. Por su parte, *A. terreus* es el que mayor actividad ACC desaminasa presenta, con un valor de 50,96±1,38 nmol α-CB*mg^{-1}*h^{-1}, seguido de *P. citrinum* con 31,38±2,19 nmol α-CB*mg^{-1}*h^{-1}.

Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica

Como se puede observar en la Tabla 2, el hongo *A. fumigatus* fue el que creció más rápidamente en el medio, utilizando carboximetil-celulosa como fuente de carbono, y el que creció de forma más lenta fue *P. citrinum*, es decir, *A. fumigatus* es el que presenta mayor actividad celulolítica teniendo en cuenta que fue el que presento mayor halo alrededor de la colonia.

Tabla 2. Resultados de la evaluación cualitativa de degradación de la celulosa, en medio CMC durante 3 días.

Hongo	Diámetro colonia+halo (Cm)
A. terreus	**0,5**
A. fumigatus	**3,26**
P. citrinum	**0,3**
Rhodotorula spp.	**Crecimiento no expansivo**

FASE II: EFECTO DE LA INOCULACIÓN SOBRE LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE SEMILLAS DE RÁBANO

Se observa en la tabla 3 que, en condiciones no salinas, las semillas de rábano no inoculadas presentan un porcentaje de germinación significativamente mayor en comparación con las condiciones 100 mM y de 200 mM de NaCl.

Tabla 3. Evaluación del efecto de la inoculación de los cuatro hongos halotolerantes, individualmente y en conjunto, sobre la germinación de semillas de rábano en tres condiciones de salinidad: 0, 100 y 200 mM. Se presenta el promedio ± desviación estándar. Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre los tratamientos de inóculo, dentro de cada uno de los grupos de salinidad. Los números romanos representan diferencias significativas entre los tratamientos de sal en el caso de las plantas control no inoculadas.

Tratamiento NaCl (mM)	Inóculo	%Germinación	Longitud total de plántula (cm)	Índice de Vigor
0	Sin inóculo	97±2,739(a)(I)	9,05±0,627(a)(I)	877,3±54,574(a)(I)
	Conjunto	94±2,236 (a)	7,461±0,716(b)	702,14±77,846(b)
	Rhodotorula spp.	94±4,183(a)	6,447±0,505(c)	604,442±24,812(b)
	P. citrinum	94±5,477(a)	9,314±0,766(a)	872,964±45,248(a)
	A. terreus	95±3,536(a)	8,259±0,638(d)	784,794±69,659(a)
	A. fumigatus	92±2,739(b)	5,466±0,359(e)	502,6±30,825(c)
100	Sin inóculo	87±4,472 (a)(II)	5,243±0,627(a)(II)	454,378±39,777(a)(II)
	Conjunto	87±2,739 (a)	5,626±0,722(a)	489,939±69,468(a)
	Rhodotorula spp.	92±4,472(c)	4,564±0,299(a)	419,1±19,067(a)

	P. citrinum	82±2,739(b)	9,898±0,202(b)	811,295±16,609(b)
	A. terreus	85±0(a)	6,901±0,602(c)	586,575±51,137(c)
	A. fumigatus	87±2,739 (a)	3,946±0,294(d)	343,8±35,151(d)

200	Sin inóculo	55±5(a)(III)	0,922±0,11(a)(III)	50,33±3,464 (a)(III)
	Conjunto	66±4,183(b)	1,922±0,286(b)	127,504±25,519 (b)
	Rhodotorula spp.	79±2,236(c)	1,671±0,148(b)	131,843±10,161 (b)
	P. citrinum	73±4,472(d)	3,004±0,281(c)	218,319±6,753 (c)
	A. terreus	52±4,472(a)	1,691±0,217(b)	87,19±5,231 (d)
	A. fumigatus	58±2,739(a)	1,486±0,055(d)	86,14±4,159 (d)

Este patrón se repite en la variable de longitud promedio de las plántulas (epicótilo junto con hipocótilo), en donde igualmente de forma global disminuye la longitud a medida que aumenta la salinidad. El índice de vigor es la multiplicación del porcentaje de germinación por la longitud de las plántulas, por consiguiente, éste sigue la misma tendencia de disminución del vigor con el aumento de la salinidad.

Ahora, observando dentro de cada grupo de salinidad, se puede notar que en las condiciones no salinas (0 mM), con respecto a la variable porcentaje de germinación las semillas inoculadas con *A. fumigatus* presentan porcentaje de germinación significativamente menor que las semillas control sin inóculo. Las demás semillas inoculadas con los otros hongos no presentan diferencias significativas con el control. En la variable longitud, se observa que solo *P. citrinum* no tiene diferencias significativas con respecto al control. Con los grupos de *A. terreus, A. fumigatus, Rhodotorula* spp. y el conjunto de hongos, se observó que las plántulas presentaron una longitud menor que el grupo control y que *P. citrinum*. No obstante, la variable que puede reunir más información es el índice de Vigor (VI), ya que representa en un

solo valor los resultados de porcentaje de germinación y longitud de las plántulas. En el VI, *P. citrinum* y el grupo control son estadísticamente iguales, mientras que los demás tratamientos tienen un vigor significativamente menor, siendo las semillas inoculadas con *A. fumigatus* las que menor VI tienen en condiciones no salinas.

En el tratamiento de salinidad 100 mM, podemos notar en términos del índice de vigor que las semillas control tienen un VI de alrededor de 454, y no presenta diferencias con el VI de las semillas inoculadas con el conjunto de hongos, ni el de las semillas del grupo con *Rhodotorula* spp. El grupo inoculado con *A. fumigatus* nuevamente presenta el menor índice de vigor. Mientras que el grupo de *P. citrinum* mostró un índice de vigor de alrededor de 811, el cual es significativamente mayor que el VI del control y del resto de grupos dentro de este tratamiento de salinidad 100 mM.

Por último, el tratamiento de salinidad de 200 mM de NaCl se observa que en la variable VI, todos los tratamientos de inóculo tienen un índice significativamente mayor que las semillas control no inoculadas. Los grupos de *P. citrinum*, *Rhodotorula* spp. y del inóculo conjunto de los cuatro hongos, son los que presentan los mayores índices de vigor en condiciones de salinidad alta (200mM).

FASE III: EFECTO DE LA INOCULACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO EN RÁBANO EN CONDICIONES DE INVERNADERO

Con respecto a la variable longitud, se puede observar que entre los tratamientos de sal 0, 100 y 200 mM, la longitud disminuye de forma significativa a medida que la salinidad aumenta. Esta tendencia de disminución significativa se repite para las variables diámetro del tubérculo, biomasa seca, número de hojas y área foliar. En otras palabras, a medida que la salinidad aumenta entre los grupos 0, 100 y 200 mM, disminuye el crecimiento de las plantas (Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación del efecto de la inoculación de los cuatro hongos halotolerantes, individualmente y en conjunto, sobre el crecimiento de plantas rábano en tres condiciones de salinidad: 0, 100 y 200 mM. Se presenta el promedio ± desviación estándar. Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre los tratamientos

de inóculo, dentro de cada uno de los grupos de salinidad. Los números romanos representan diferencias significativas entre los tratamientos de sal en el caso de las plantas control no inoculadas.

Tratamiento NaCl(mM)	Inóculo	Longitud total(cm)	Diámetro tubérculo (cm)	Biomasa seca(g)	No. de hojas	Área foliar (mm^2)
0	Sin inóculo	50±1,19(a)(I)	4,72±0,13(a)(I)	3,534±0,223(a)(I)	7,4±0,89(a)(I)	2495,13±404,293(a)(I)
	Conjunto	76,72±2,12(c)	4,76±0,38(a)	3,83±0,537(a)	7,4±0,55(a)	2499,378±219,443(a)
	Rhodotorula spp.	50,42±1,96(a)	4,7±0,25(a)	3,894±0,867(a)	8±0,71(a)	2976,108±363,698(a)
	P. citrinum	87±3,06(b)	5,88±0,26(b)	5,3±0,674(b)	8,6±0,55(a)	3114,849±75,49(a)
	A. terreus	50,32±0,96(a)	4,7±0,22(a)	3,83±0,917(a)	8±0,71(a)	2909,584±628,849(a)
	A. fumigatus	50,2±1,49(a)	4,74±0,26(a)	3,814±0,992(a)	7,4±0,55(a)	3039,19±391,355(a)
100	Sin inóculo	31,06±1,72(a)(II)	1,62±0,27(a)(II)	2,532±0,254(a)(II)	5,6±0,55(a)(II)	2024,381±907,422(a)(II)
	Conjunto	41,54±0,87(c)	1,6±0,07(a)	2,7±0,89(a)	6±0,71(a)	2008,336±220,22(a)
	Rhodotorula spp.	31,1±0,74(a)	1,58±0,13(a)	2,548±0,363(a)	5,4±0,55(a)	2074,346±768,87(a)
	P. citrinum	45,64±1,66(b)	3,4±0,43(b)	5,048±0,955(b)	8,8±0,84(b)	2910,919±171,844(b)
	A. terreus	31,28±1,39(a)	1,72±0,16(a)	2,56±0,419(a)	5,2±0,84(a)	2190,985±241,935(a)
	A. fumigatus	31,08±0,89(a)	1,74±0,21(a)	2,786±0,252(a)	8,6±0,55(b)	2292,661±192,219(a)
200	Sin inóculo	18,52±1,8(a)(III)	0,9±0,12(a)(III)	1,116±0,622(a)(III)	3,8±0,45(a)(III)	405,531±31,978(a)(III)
	Conjunto	34,4±2,76(b)	1,86±0,34(b)	3,326±0,557(b)	5,2±0,84(b)	946,461±27,262(b)
	Rhodotorula spp.	28,38±3,06(c)	1,34±0,22(c)	1,846±0,82(a)	6,6±0,89(c)	824,288±92,923(c)
	P. citrinum	38,1±3,2(b)	1,98±0,19(b)	3,052±0,611(b)	6,6±0,89(c)	848,064±95,18(c)
	A. terreus	28±3,39(c)	1,4±0,19(c)	2,998±0,952(b)	6,6±0,55(c)	850,946±43,052(c)
	A. fumigatus	28,24±2,68(c)	1,36±0,21(c)	2,592±0,735(b)	5,8±0,45(c)	835,184±83,841(c)

Detallando dentro de cada tratamiento de sal, se puede ver que en el grupo de plantas que fueron regadas con agua destilada, el grupo 0 mM, los únicos grupos diferentes al control corresponden a las plantas inoculadas con *P. citrinum* y el conjunto de hongos, ya que estas plantas muestran longitudes totales significativamente mayores. En el tratamiento de 100 mM, nuevamente los grupos de *P. citrinum* y el conjunto son

los que presentan longitudes significativamente mayores con respecto al grupo control no inoculado. En 200 mM, se puede observar que todos los grupos presentan longitudes mayores que las plantas control; sin embargo, *P. citrinum* y el conjunto de hongos son los que presentan mayor longitud bajo estas condiciones de salinidad.

En cuanto a la variable diámetro del tubérculo, en condiciones no salinas, el grupo de plantas inoculadas con *P. citrinum*, mostró un diámetro significativamente mayor que el control y que el resto de los tratamientos. De Igual forma en condiciones de 100 mM de NaCl, *P. citrinum* es el único grupo que tiene diferencias significativas con el control y los demás tratamientos. En 200 mM, todos los tratamientos de inóculo tienen mayor diámetro que las plantas no inoculadas.

Respecto a la biomasa seca, en condiciones no salinas y en 100 mM de NaCl, las plantas inoculadas con *P. citrinum* son las únicas que presentaron un peso seco significativamente mayor que el grupo control y el resto de los tratamientos. Mientras que, en 200 mM, los grupos tanto de *P. citrinum* como *A. terreus*, *A. fumigatus* y el conjunto de hongos presentan una biomasa mayor que el control.

Con relación al número de hojas, en condiciones no salinas, ningún tratamiento presenta diferencias significativas con el control. Al aumentar la salinidad a 100 mM, *P. citrinum y A. fumigatus* presentan aproximadamente 3 hojas más que el grupo control. En 200 mM, todos los tratamientos tienen más hojas que el grupo control, ya que el grupo control tuvo en promedio de 3 a 4 hojas, mientras que todos los tratamientos tuvieron entre 5 y 7 hojas en promedio.

Por último, la variable área foliar, en condiciones 0 mM de NaCl, ningún tratamiento es estadísticamente diferente al control. En 100 mM, el único tratamiento que tuvo mayor área foliar que el control fue el de plantas inoculadas con *P. citrinum*. Bajo las condiciones de 200 mM, todos los tratamientos de inóculo tienen significativamente mayor área foliar que las plantas no inoculadas.

FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA A Y PIGMENTOS CLOROFILAS

Se observa que en las plantas control no inoculadas a medida que aumenta la salinidad entre 0, 100 y 200 mM de NaCl, disminuyes significativamente los valores de Fv/Fm, PIabs, contenido de clorofilas totales y de carotenoides (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación del efecto de la inoculación de los cuatro hongos halotolerantes, individualmente y en conjunto, sobre parámetros de fluorescencia de la clorofila a y pigmentos de plantas rábano en tres condiciones de salinidad: 0, 100 y 200 mM. Eficiencia máxima potencial del PSII Fv/Fm, índice de desempeño o vitalidad del PSII PIabs. Se presenta el promedio ± desviación estándar. Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre los tratamientos de inóculo, dentro de cada uno de los grupos de salinidad. Los números romanos representan diferencias significativas entre los tratamientos de sal en el caso de las plantas control no inoculadas.

Tratamiento NaCl (mM)	Inóculo	Fv/Fm	PIabs	Clorofilas totales (mg*g^{-1})	Carotenoides(mg*g^{-1})
0	Sin inóculo	0,8453±0,0029(a)(I)	5,734±0,68(a)(I)	1,146±0,025(a)(I)	0,2274±0,0093(a)(I)
	Conjunto	0,8463±0,0076(a)	5,474±0,718(a)	1,174±0,295(a)	0,2436±0,0332(a)
	Rhodotorula spp.	0,8462±0,0105(a)	5,889±0,992(a)	1,07±0,064(a)	0,2219±0,0659(a)
	P. citrinum	0,8444±0,0046(a)	5,763±0,475(a)	1,626±0,105(b)	0,2808±0,039(a)
	A. terreus	0,8427±0,0063(a)	5,383±0,481(a)	1,124±0,091(a)	0,2292±0,0827(a)
	A. fumigatus	0,8429±0,0046(a)	5,596±0,827(a)	1,114±0,09(a)	0,2452±0,0183(a)
100	Sin inóculo	0,8104±0,0152(a)(II)	4,222±0,808(a)(II)	0,403±0,006(a)(II)	0,0728±0,0016(a)(II)
	Conjunto	0,8132±0,0152(a)	4,78±0,797(a)	0,484±0,011(b)	0,0727±0,0118(a)
	Rhodotorula spp.	0,8191±0,0109(a)	4,547±0,37(a)	0,446±0,031(c)	0,085±0,0137(b)
	P. citrinum	0,8346±0,0029(b)	5,761±0,643(b)	0,661±0,038(d)	0,1262±0,0275(c)
	A. terreus	0,8182±0,007(a)	4,771±0,666(a)	0,452±0,038(c)	0,073±0,0071(a)
	A. fumigatus	0,8138±0,0124(a)	4,26±0,257(a)	0,464±0,031(c)	0,0865±0,0149(a)
200	Sin inóculo	0,7998±0,0358(a)(III)	3,149±0,838(a)(III)	0,328±0,011(a)(III)	0,0614±0,0059(a)(III)

	Conjunto	0,7985±0,0144(a)	3,996±0,9868(a)	0,34±0,038(a)	0,0688±0,0014(a)
	Rhodotorula spp.	0,7997±0,0041(a)	3,766±0,705(a)	0,331±0,008(a)	0,0664±0,0043(a)
	P. citrinum	0,8231±0,0076(a)	5,139±0,398(b)	0,452±0,028(b)	0,0715±0,0357(a)
	A. terreus	0,7997±0,0038(a)	4,111±0,415(a)	0,376±0,009(c)	0,0611±0,0152(a)
	A. fumigatus	0,7975±0,0195(a)	3,491±0,798(a)	0,326±0,004(a)	0,061±0,0167(a)

Para la variable eficiencia máxima potencial del PSII Fv/Fm, en condiciones de salinidad 0, no hay diferencias significativas entre los tratamientos y en control; tampoco se observan síntomas de estrés de las plantas pues los valores están cercanos a 0,82-0,83 como lo reporta la literatura (Maxwell y Johnson, 2001). Al aumentar la salinidad a 100mM en el agua de riego, las plantas inoculadas con *P. citrinum* tienen el mejor valor Fv/Fm ligeramente mayor que el grupo control. En el tratamiento de 200mM, la mejor Fv/Fm se observa en las plantas inoculadas con *P. citrinum*.

Con respecto al índice de vitalidad de la muestra (PIabs), nuevamente como en Fv/Fm, en condiciones 0 mM, no hay diferencias significativas entre ningún grupo. En 100 y 200 mM, el grupo de *P. citrinum*, son las únicas plantas con los mejores valores PIabs.

En cuanto al contenido de clorofilas totales, en condiciones salinas de 100 mM, todos los grupos inoculados tienen un contenido significativamente mayor de clorofilas con respecto al control. Bajo las condiciones de 200 mM, solo *P. citrinum* y *A. terreus* tienen diferencias significativas con el grupo control, ya que tienen mayor contenido de clorofilas que las plantas control.

En cuanto a los carotenoides, en condiciones no salinas, ningún tratamiento es estadísticamente diferente al control. En 100 mM, los grupos de plantas inoculadas con *Rhodotorula* spp. y *P. citrinum* presentan mayor contenido de carotenoides; sin embargo, en condiciones de 200 mM, ningún tratamiento presenta diferencias significativas con respecto al grupo control.

ESTADO HÍDRICO Y CONTENIDO DE PROLINA

Conductancia estomática y el contenido de agua en hojas y tubérculo (Tabla 6), se observa que, en el grupo de plantas control no inoculadas, a medida que aumenta la salinidad entre 0, 100 y 200, disminuyen los valores de las tres variables.

Tabla 6. Efecto de la inoculación de los cuatro hongos halotolerantes, individualmente y en conjunto, sobre variables del estado hídrico y contenido de prolina de plantas rábano en tres condiciones de salinidad: 0, 100 y 200 mM.

Se presenta el promedio ± desviación estándar. Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre los tratamientos de inóculo, dentro de cada uno de los grupos de salinidad. Los números romanos representan diferencias significativas entre los tratamientos de sal en el caso de las plantas control no inoculadas.

Tratamiento NaCl(mM)	Inóculo	g_s (mmol $H_20*m^{-2}*s^{-1}$)	CHR	%Agua tubérculo	%Agua hojas	Prolina (µg*g^{-1})
0	Sin inóculo	230,36±8,67(a)(I)	93,231±3,503 (a)(I)	10,438±0,238 (a)(I)	8,368±1,657(a)(I)	5,6±0,683(a)(I)
	Conjunto	229,42±5,06(a)	91,868±5,809 (a)	12,524±0,344(c)	8,384±0,824(a)	5,4±0,149(a)
	Rhodotorula spp.	262,88±9,72(b)	88,359±5,254 (a)	12,108±0,766(c)	8,954±0,231(a)	4,867±0,691(a)
	P. citrinum	270,38±9,22(b)	86,292±6,913 (a)	13,975±0,745 (b)	9,425±1,445(a)	5,333±0,333(a)
	A. terreus	258,16±6,15(c)	86,414±4,089 (a)	12,205±0,694(c)	8,48±0,479(a)	6,333±0,577(a)
	A. fumigatus	240,64±3,3(a)	90,88±4,518 (a)	12,758±0,548(c)	8,36±0,156(a)	5,6±0,548(a)
100	Sin inóculo	92,1±2,75(a)(II)	92,207±6,95 (a)(I)	10,052±0,573 (a)(I)	5,49±0,22(a)(II)	249,6±3,715(a)(II)
	Conjunto	92,3±8,33(a)	82,182±4,481 (a)	10,45±0,544(a)	5,832±0,828(a)	180,2±1,282(b)
	Rhodotorula spp.	119,28±8,43(b)	91,758±7,192 (a)	10,397±0,731 (a)	5,864±0,526(a)	150,733±1,535(c)

	P. citrinum	108,62±4,63(c)	85,612±8,629 (a)	15,32±0,338(b)	6,218±0,114(a)	91,4±0,983(d)
	A. terreus	102,66±4,23(c)	88,908±9,696 (a)	10,42±0,719(a)	5,404±0,498(a)	163,067±2,241(e)
	A. fumigatus	106,84±3,77(c)	88,728±9,667 (a)	10,323±0,394 (a)	5,542±0,413(a)	118,533±2,036(f)
200	Sin inóculo	51,58±0,95(a)(III)	88,409±2,904 (a)(I)	8,422±0,423(a) (III)	0,701±0,27(a)(III)	753,133±21,629(a) (III)
	Conjunto	52,28±2,3(a)	88,527±3,737 (a)	8,466±0,449(a)	0,87±0,224(a)	555,333±15,226(c)
	Rhodotorula spp.	57,34±5,52(a)	82,16±7,241 (a)	8,714±0,659(a)	0,895±0,073(a)	683,333±16,775(b)
	P. citrinum	56,48±2,71(a)	83,233±4,648 (a)	10,047±0,718 (b)	1,163±0,379(a)	436,733±13,332(d)
	A. terreus	54,32±4,22(a)	87,433±3,772 (a)	8,432±0,973(a)	1,151±0,375(a)	771,2±25,156(a)
	A. fumigatus	56,74±2,42(a)	88,021±6,52 (a)	8,834±0,444(a)	1,162±0,063(a)	679,933±15,729(b)

Para el caso de CHR, no hay diferencias significativas entre los tres tratamientos de salinidad, ni tampoco entre los tratamientos de inoculantes, por lo que esta variable podría ser considerada como poca informativa en cuanto a la posible mitigación de estrés por salinidad mediante la inoculación de los hongos mencionados.

La conductancia estomática de las plantas en condiciones de salinidad 100 mM es mayor que las plantas control. Sin embargo, al pasar a 200 mM, de los grupos de plantas sometidas a dichas condiciones, ninguno es significativamente diferente del grupo control.

Referente a la variable de contenido de agua en el tubérculo, tanto en 100 como en 200 mM, las plantas tratadas con *P. citrinum* presentaron mayor contenido de agua en el tubérculo que las plantas del grupo control. En el contenido de agua en hojas tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, en ninguna de las tres condiciones, 0, 100 y 200 mM. Tampoco se encontraron

diferencias en el CHR, variable que también se relaciona con el contenido de agua en las hojas.

Con respecto a la variable contenido de prolina (Tabla 6), en plantas no inoculadas, a diferencia de todas las demás variables evaluadas, las cuales a medida que aumenta la salinidad disminuyen sus valores. Se observa que el contenido de prolina aumenta a medida que la salinidad aumenta entre 0, 100 y 200 mM.

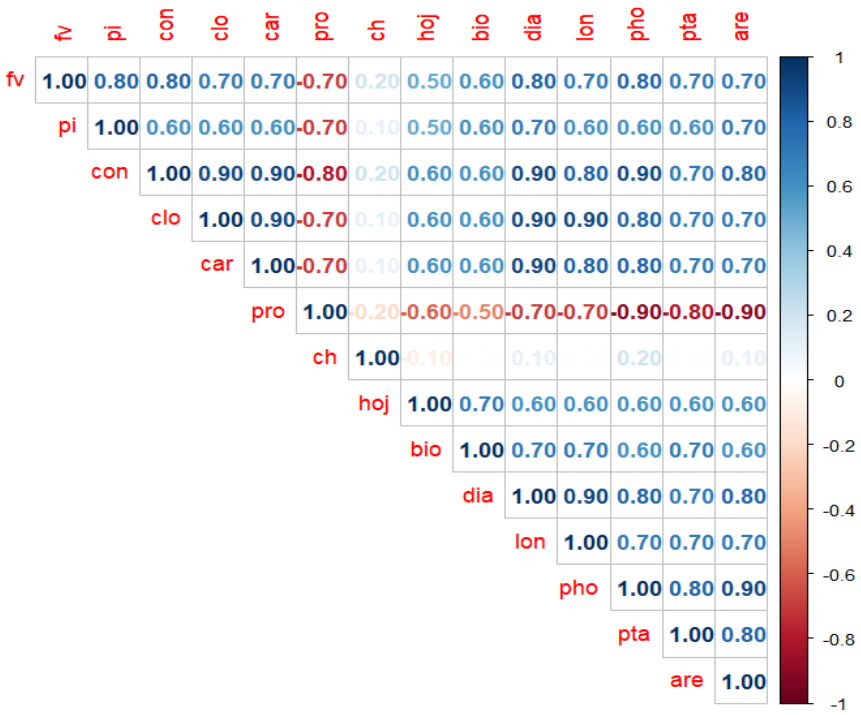
Cuando las plantas se regaron con agua a salinidad 100 mM, todos los tratamientos tuvieron menos prolina que las plantas control. En 200 mM, solo las plantas inoculadas con *Rhodotorula* spp., *A. fumigatus* y *P. citrinum* presentaron valores de prolina significativamente menores al de las plantas control.

ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Matriz de correlaciones y test de correlación de Pearson

A continuación, se presentan los valores de correlación de Pearson para las variables tomadas del bioensayo en invernadero (Figura 3). Para comprobar la correlación se utilizó la prueba de correlación de Pearson con $\alpha = 0,05$, donde la hipótesis nula es que las variables no están correlacionadas. Se encontró que la variable CHR no está correlacionada con ninguna de las otras variables de crecimiento y fisiología; mientras que todas las demás variables están correlacionadas unas con otras. Como observación, la variable más cerca a ser aceptada como correlacionada con CHR, fue el contenido agua en hojas con un valor p de 0,054; sin embargo, por ser mayor de 0,05 se aceptó la hipótesis nula, de que no están correlacionadas. Esto tiene sentido porque el CHR se midió en discos foliares, así que, sí se esperaba que el contenido de agua en hojas estuviera relacionado, sin embargo, de acuerdo con la prueba estadística de correlación a dicho valor de significancia, no lo están.

Figura 3. Coeficiente de correlación de las variables de crecimiento y fisiología. Donde: fv: Fv/Fm, pi: PIabs, con: conductancia estomática, clo: contenido de clorofilas, car: contenido de carotenoides, pro: contenido de prolina, ch: CHR, hoj: número de hojas, bio: biomasa, dia: diámetro máximo, lon: longitud total, pho: porcentaje de agua en hojas, pta: porcentaje de agua en tubérculo, are: área foliar.



Análisis de Componentes Principales (ACP)

Los componentes principales son las combinaciones lineales de las variables originales que explican la varianza en los datos. El número máximo de componentes extraídos siempre es igual al número de variables (Dallas, 2000).

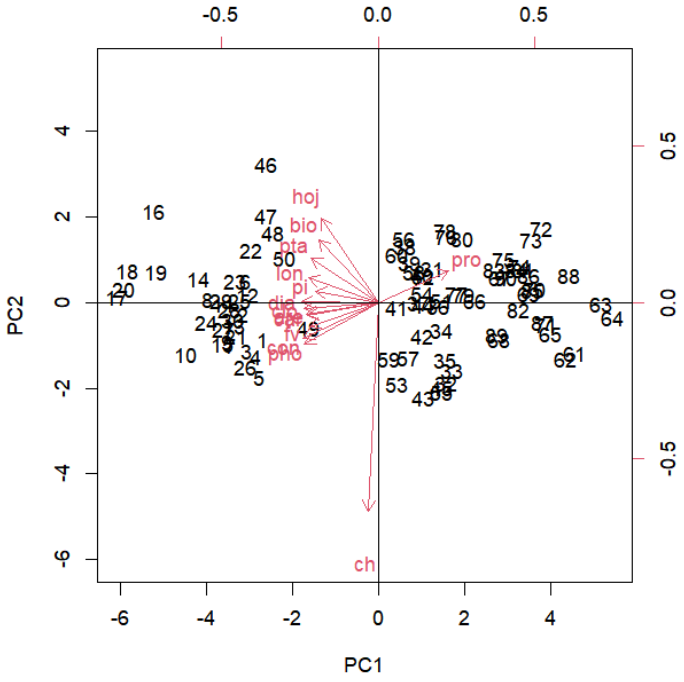
Con base en los resultados de las variables de crecimiento y fisiología se obtuvo que, al reducir la dimensionalidad a dos componentes, éstos explican el 77% de la varianza total. El componente número 1 explica el 69,12% de la varianza, y el componente número 2 el 8,16% (Figura 4).

Al tomar los dos primeros componentes, las variables que más influyen en el componente 1 son el contenido de clorofilas y de carotenoides, prolina, diámetro del tubérculo y área foliar. Mientras que para el componente número 2, la variable que más influye es el CHR.

Se puede ver que la mayoría de las variables tienen influencia negativa sobre el componente 1, excepto contenido de prolina, esto se debe a que la mayoría de las variables presentan un patrón de disminución a medida que la salinidad aumenta, mientras que en el caso de la prolina ocurre, al contrario, a medida que la salinidad aumenta el contenido de prolina también lo hace.

La variable CHR no afecta al componente 1. Mientras que en el componente 2, CHR tiene una fuerte influencia negativa. En otras palabras, se pueden nombrar al componente 1 como crecimiento, fluorescencia de la clorofila y pruebas bioquímicas, y al componente dos se le puede llamar CHR. Relacionando estos resultados con los de la prueba de correlación de Pearson, podemos notar que el CHR es la única de las variables que no se correlaciona con ninguna de las demás, además es la única que no muestra diferencias significativas entre tratamientos de salinidad ni de inoculación, por lo que para la presente investigación podría considerarse que la variable CHR es poco informativa.

Figura 4. Análisis de componentes principales para las variables de crecimiento y fisiología. Gráfica de doble proyección para evaluar la estructura de los datos y las influencias de los dos primeros componentes.



Análisis de clúster o de agrupación

Para el análisis de agrupación por K- means, se determinó que el número óptimo de clústers en los que se podían agrupar a los individuos era dos, ya que, de tres métodos utilizados, el de suma de cuadrados o método del codo de la curva y el método de la silueta promedio sugerían 2 grupos, mientras que el método de brechas estadísticas o GAPs sugería 3. Así que se realizó el análisis de agrupamiento teniendo en cuenta 2 y 3 grupos para comparar los resultados.

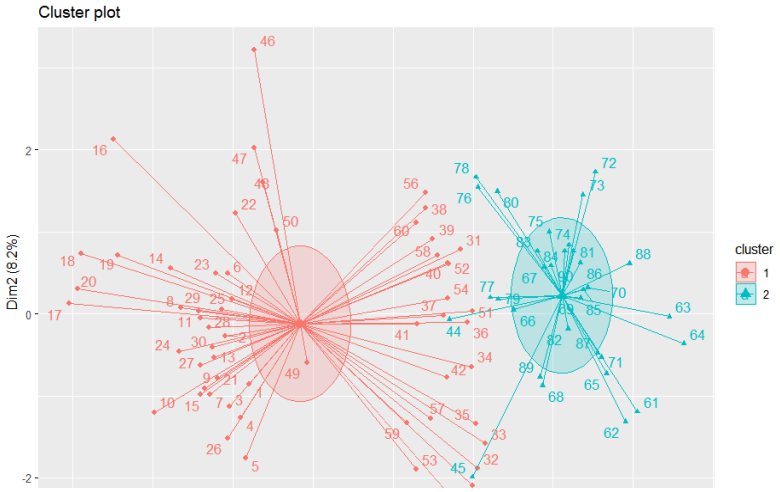
Teniendo en cuenta que los individuos entre 1 a 30 estaban en salinidad 0 mM, de 31 a 60 en salinidad 100 mM, y de 61 a 90 en 200 mM, podemos ver en el clúster plot de la figura 5a que partiendo de solo dos clústeres los individuos del 1 al 60 tienden a formar un grupo, y del 61 al 90 a formar otro grupo.

Mientras que en la figura 5b, observamos que, al iniciar el análisis con tres clústeres, hay muchos sobrelapamientos entre los individuos de 0 mM y 100 mM, que son los individuos 1 a 60. Por lo que se puede decir que entre los individuos sometidos a salinidad 100 mM y los que crecieron en condiciones no salinas no hay una estructuración tan fuerte; sin embargo, al compararlos con los individuos de 200 mM de NaCl, si se nota un agrupamiento con pocos sobrelapamientos.

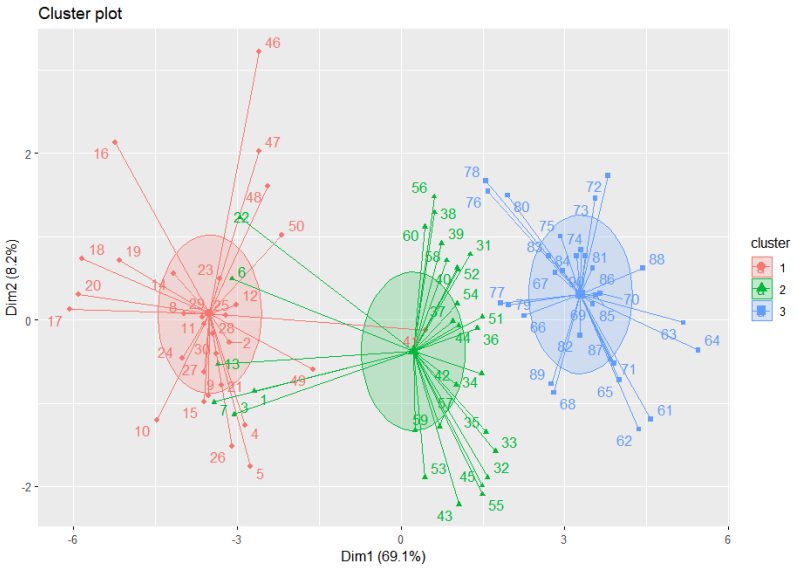
En otras palabras, de acuerdo con este análisis las plantas creciendo en condiciones no salinas y en 100 mM se comportan de forma similar en cuanto a las variables de crecimiento y fisiología evaluadas; pero las que crecen en condiciones de 200 mM, sí se ven drásticamente afectadas y no podrían agruparse con las plantas control 0 mM de NaCl. Es decir, la salinidad a 100 mM, de acuerdo con estos resultados de agrupamiento, no fue tan drástica, pero a 200 mM, si hubo una afectación fuerte en el desempeño fisiológico de las plantas de rábano.

Figura 5. Análisis de clúster a) Estructuración de los individuos tomando solo dos grupos b) Tomando tres grupos.

a)



b)



EFECTIVIDAD GENERAL

Por último, como un resumen de todos los resultados obtenidos, se elaboraron las siguientes tablas de puntaje (Tabla 7, tabla 8, Tabla 9), para resumir el desempeño de los hongos con respecto a las distintas variables:

1) **Puntaje *in vitro***, (Tabla 7), en el cual se tuvo en cuenta los datos de las variables % de solubilización de P, ACC D y AIA. A cada hongo se le asignó un puntaje teniendo en cuenta su desempeño en los tres mecanismos mencionados, así: (-) no tiene la actividad, (+) actividad leve, (++) actividad media, actividad alta (+++). Para definir los niveles se tuvo en cuenta el mayor y menor valor obtenido para cada variable para los cuatro hongos. De tal forma que el puntaje máximo que podría tener un hongo *in vitro* era de 8.
2) **Puntaje en germinación, (Tabla 8) para** determinar el puntaje de desempeño del hongo sobre la germinación de las plantas de rábano, en comparación con

el control, se realizó la siguiente categorización, dependiendo de si el hongo generaba un aumento o disminución significativa en cada variable, con respecto al control:

-1 efecto negativo, 0 neutral, 1 positivo. Por ejemplo, el efecto positivo sobre el porcentaje de germinación se definía si las plantas inoculadas con un determinado hongo presentaron un porcentaje significativamente mayor que el control. Así que, como para la fase germinación, se evaluaron tres variables, el puntaje máximo era 3.

3) **Puntaje en crecimiento y fisiología** (tabla 9) para determinarlo, al igual que con el puntaje de desempeño sobre la germinación, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos para las 14 variables de crecimiento y fisiología: Fv/Fm, PIabs, clorofilas totales, carotenoides, prolina, conductancia estomática, CHR, % de agua del tubérculo, % de agua en hojas, longitud, diámetro, biomasa, Número de hojas y área foliar. Igualmente, las categorías eran: -1 efecto negativo, 0 neutral, 1 positivo, para cada variable. Al final, el puntaje máximo que podía obtener un hongo era 14. Con base en esto, se calculó un porcentaje de efectividad el cual consiste en el número de puntos de un hongo divido en el número máximo de puntos posibles. Dependiendo de si se trata de las condiciones 0 mM de NaCl se puede interpretar como la efectividad en la promoción del crecimiento, y si se trata de las condiciones 100 y 200 mM se interpreta como efectividad de la inoculación en la mitigación del estrés por salinidad.

Tabla 7. Puntaje de cada hongo con respecto a su desempeño *in vitro* en los mecanismos de: solubilización de fosfatos, producción de AIA, y actividad ACCD

Hongo	Solubilización de P	ACC D	AIA	Puntaje *in vitro*
Rhodotorula spp.	+++	+	++	6
A. fumigatus	++	+	-	3
A. terreus	+	+++	-	4
P. citrinum	++	++	+	5

Tabla 8. Puntajes de desempeño con respecto al efecto de la inoculación sobre la germinación de semillas de rábano, en tres variables: % germinación, longitud total de la plántula e índice de vigor

Efecto sobre germinación *In vitro*				
Tratamiento NaCl (mM)	**Inóculo**	**Puntaje (3 variables)**	**Efecto**	**%Efectividad**
0	Conjunto	-2	Negativo	-66,7
	Rhodotorula spp.	-2	Negativo	-66,7
	P. citrinum	1	Positivo	33,3
	A. terreus	-1	Negativo	-33,3
	A. fumigatus	-3	Negativo	-100,0
100	Conjunto	0	Neutral	0,0
	Rhodotorula spp.	-1	Negativo	-33,3
	P. citrinum	1	Positivo	33,3
	A. terreus	2	Positivo	66,7
	A. fumigatus	-2	Negativo	-66,7
200	Conjunto	3	Positivo	100,0
	Rhodotorula spp.	3	Positivo	100,0
	P. citrinum	3	Positivo	100,0
	A. terreus	2	Positivo	66,7
	A. fumigatus	2	Positivo	66,7

Tabla 9. Puntajes de desempeño de la inoculación sobre 14 variables de crecimiento vegetativo y variables fisiológicas de plantas de rábano.

Efecto sobre crecimiento y fisiología				
Tratamiento NaCl (mM)	**Inóculo**	**Puntaje (14 variables)**	**Efecto**	**%Efectividad**
0	Conjunto	2	Positivo	14,3

	Rhodotorula spp.	2	Positivo	14,3
	P. citrinum	6	Positivo	42,9
	A. terreus	2	Positivo	14,3
	A. fumigatus	1	Positivo	7,1
100	Conjunto	3	Positivo	21,4
	Rhodotorula spp.	4	Positivo	28,6
	P. citrinum	12	Positivo	85,7
	A. terreus	3	Positivo	21,4
	A. fumigatus	4	Positivo	28,6
200	Conjunto	6	Positivo	42,9
	Rhodotorula spp.	6	Positivo	42,9
	P. citrinum	9	Positivo	64,3
	A. terreus	6	Positivo	42,9
	A. fumigatus	6	Positivo	42,9

10.DISCUSIÓN

HALOTOLERANCIA DE LOS HONGOS Y MECANISMOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

En general, el estrés abiótico en plantas, como por ejemplo el estrés salino, se traduce en estrés oxidativo, por la generación excesiva de ROS que pueden dañar membrana celular por peroxidación de lípidos, entre otros (Moukthari et al., 2020), lo cual influye finalmente en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

A medida que la salinidad aumenta, encontramos que el crecimiento de las plantas de rábano disminuye, y esto se debe a la toxicidad que genera el exceso de NaCl y también al estrés osmótico (Jamil et al., 2007).

En suelos salinos, el exceso de Na^+ impide la toma de otros cationes como K^+ y Ca^{2+}, los cuales son necesarios en la señalización de muchos procesos celulares y en el ajuste osmótico. Los iones K^+ y Na^+ compiten por la entrada en las células debido a que tienen propiedades similares como el radio iónico. Como resultado, en la planta se presenta estrés por exceso de Na^+ y deficiencia de K^+ (Zhao et al., 2007).

Además, la salinidad afecta el metabolismo del nitrógeno en las plantas en las etapas de: toma de nitrógeno, asimilación de iones amonio y reducción de iones nitratos; debido a que afecta enzimas como la nitrato-reductasa. Adicionalmente, se ha reportado que la salinidad afecta la simbiosis entre bacterias fijadoras de nitrógeno y algunas especies de plantas a las que se asocian, ya que la salinidad disminuye la efectividad de los simbiontes en el proceso de fijación biológica (Moukthari et al., 2020; Ashraf et al., 2018).

Por otra parte, el área foliar en plantas de rábano sometidas a salinidad disminuyó considerablemente. Sin embargo, la salinidad no tuvo efecto sobre el contenido de agua en hojas ni en el CHR en rábano, como también lo reportan Jamil et al., (2007).

Salazar et al., (2022) reportaron que el estrés abiótico por anegación en rábano afecta negativamente el diámetro de la raíz tuberosa. Además, que la inoculación de *Azospirillum brasiliense* mitiga los efectos del estrés, ya que las plantas no inoculadas tuvieron en promedio un diámetro de 12,08 mm, mientras que las inoculadas tuvieron en promedio un diámetro de 33,04 mm. Los autores atribuyeron este efecto a la producción de reguladores de crecimiento por parte de la bacteria, como AIA y giberelinas.

También se ha reportado que dentro de los géneros de hongos más estudiados por su actividad como promotores del crecimiento vegetal se encuentran: *Aspergillus, Trichoderma y Penicillium*. Éstos hacen parte del grupo llamado Plant growth-promoting fungi o PGPF, en español: Hongos Promotores del Crecimiento Vegetal (Hossain et al., 2017; Brotman et al., 2013).

A. terreus

Yoo et al., (2018) mencionan que *A. terreus* es un hongo endófito que promueve el crecimiento de plantas de tomate, debido a que produce fenoles, flavonoides y fitohormonas. *A. terreus* ha sido extensamente estudiado como agente de control biológico y como microorganismo promotor del crecimiento vegetal. Sin embargo, también se conoce como fitopatógeno de plantas como el arroz, maíz y soya (Vassileva et al., 2020; Javed et al., 2020). Por lo que la determinación de la concentración ideal de inoculante de cada hongo es crucial, ya que, dependiendo de esto, en algunas especies vegetales, los hongos pueden actuar como patógenos o como promotores.

De acuerdo con Abdel et al., (2018) cepas de *A. terreus* halotolerantes aisladas de suelos salinos, mostraron la capacidad de solubilizar fosfatos, por medio de la producción de ácidos orgánicos, en condiciones de salinidad superior al 10% de NaCl.

Li *et al.*, (2021) reportaron que la inoculación con el hongo *Aspergillus aculeatus* promueve el crecimiento y mitiga estrés por altas temperaturas y déficit hídrico en plantas de pasto. Debido a que este hongo puede reducir los daños causados por el estrés oxidativo, por medio de la estabilización de la membrana, actividad de enzimas antioxidantes y producción de solutos compatibles.

En el caso del aislamiento de *A. terreus* de nuestro estudio, produjo 50,96 nmol α CB*mg^{-1}*h^{-1} que se encuentra dentro del rango reportado por Khan et al (2022) de 20 a 80 nmol α CB *mg^{-1}*h^{-1} dependiendo del tiempo de crecimiento en el cual se realice la determinación.

Además, *A. terreus* cuenta con la capacidad de mitigar estrés por salinidad en plantas de trigo, de acuerdo con Khan et al., (2022). Por medio de su actividad ACC desaminasa, solubilización de fosfatos, producción de AIA y de sideróforos. Las plantas de trigo fueron sometidas a 4 diferentes concentraciones de NaCl 0, 60, 120 y 180 mM, en dicho estudio, las plantas inoculadas con *A. terreus* tuvieron mayor longitud total, biomasa y contenido de clorofilas.

Adicionalmente, en el caso del aislamiento de *A. terreus* del presente estudio, éste no produjo niveles detectables de AIA mediante el método colorimétrico utilizado. En contraste, Khan et al., (2022) mencionan que *A. terreus* cuenta con buen desempeño en la producción de AIA.

Por otra parte, Khan et al., (2012), reportan que la inoculación con *A. terreus* en plantas de trigo bajo condiciones de salinidad, aumenta el contenido de clorofilas y carotenoides en comparación con las plantas no inoculadas, además de favorecer el crecimiento en términos de la longitud total y peso seco, a lo encontrado en la presente investigación. En cuanto al contenido de prolina, en trigo, los autores, comunican que el contenido de prolina también aumenta a medida que aumenta los niveles de salinidad entre 0, 60, 120 y 160 mM.

Teniendo en cuenta que, en condiciones de salinidad, las plantas se ven expuestas a toxicidad por exceso de Na+ y deficiencia de K+, la actividad de los hongos aumentando la disponibilidad de este último puede contribuir a reducir la toma de iones Na+ por parte de las raíces, por medio de un efecto de aumento de concentración de K+, así la relación Na+/K+ disminuye, lo cual es positivo para la mayoría de los procesos celulares de las plantas (Moukhari et al., 2020).

Meen et al., (2014). mencionan que *A. terreus* puede solubilizar potasio en medio líquido, utilizando dos fuentes de potasio: feldespato de potasio y silicato de aluminio-potasio (Mica), por medio de la producción de ácidos orgánicos.

Se debe tener en cuenta que los hongos A. *terreus* y *A. fumigatus*, se han reportado como patógenos humanos, causantes de aspergilosis especialmente en pacientes inmunocomprometidos (De Lucca, 2007). No obstante, la manipulación segura que se aplica en procesos biotecnológicos ha permitido su uso en la producción de ciertos medicamentos y otros productos. Generalmente, estos productos se obtienen mediante el aprovechamiento de los metabolitos producidos, pero no de las hifas y esporas del hongo, sino los filtrados de los compuestos que sintetizan (Vassileva et al., 2020). Por ejemplo, a partir del hongo *A. terreus* se producen compuestos químicos usados en medicina, como lovastatina, terreina, y ciclosporina A (Okabe et al., 2009).

A. fumigatus

A. fumigatus es también un hongo endófito, y su inoculación en *Oxalis corniculata* promueve el crecimiento, debido a sus mecanismos de: producción de sideróforos, solubilización de fosfatos y producción de AIA y giberelinas. Las plantas de *O. corniculata* inoculadas con *A. fumigatus* presentaron mayores valores de biomasa, contenido de clorofilas y longitud total (Bilal et al., 2018).

En el caso del aislamiento de *A. fumigatus* que se utilizó en la presente investigación, sí tiene actividad ACC desaminasa, a pesar de que es baja (Penrose y Glick, 2003). Debido a que se considera que la actividad de esta enzima es baja cuando está por debajo de 20 nm α-CB $*mg^{-1}*h^{-1}$, y *A. fumigatus* produjo 9 αcb $*mg^{-1}*h^{1}$.

De acuerdo con Asif et al., (2018), *A. fumigatus* produce AIA y flavonoides, los cuales están asociados con la colonización de las raíces de maíz y promoción del crecimiento. Bibi et al., (2018) también reportan a *A. fumigatus* como hongo endófito de lechuga, y mencionan que funciona como promotor del crecimiento y mitigador de estrés en altas concentraciones de metales pesados, como el cromo, por lo que los autores concluyen que este hongo se puede usar como biofertilizante en suelos contaminados con Cr, debido a su efecto biorremediador y detoxificarte. Ya que su inoculación lograba que en las plantas de lechuga sometidas a Cr en el suelo presentaran valores de variables de crecimiento como longitud y biomasa, estadísticamente iguales a los de las plantas que no estaban bajo estrés por metales pesados. Además, los autores Bibi et al., (2018) encontraron que, aunque *A. fumigatus* produce AIA, solubiliza fosfatos y produce sideróforos, no tiene actividad ACC desaminasa.

De acuerdo con Khan et al., (2011) *A. fumigatus* es conocido por la producción de giberelinas, además de que se ha demostrado que actúa como promotor del crecimiento vegetal soya bajo condiciones de salinidad. Las plantas de soya inoculadas con *A. fumigatus* mostraron mejores resultados en cuanto a longitud total, biomasa, área foliar, contenido de clorofilas y tasa fotosintética, en comparación con las plantas no inoculadas, en condiciones de salinidad de 70 y 140 mM de NaCl.

Islam et al., (2013) encontraron que la inoculación con hongos endófitos del género *Aspergillus*, promueve el crecimiento de plantas de pepino, teniendo en cuenta las variables de peso fresco y seco, longitud, área foliar y contenido de clorofilas. Además, dentro del género *Aspergillus*, Galeano et al., (2021) reportan que la especie A. *niger* produce AIA, solubiliza fosfatos y produce sideróforos, además de que tiene actividad ACC desaminasa, por lo que promueve crecimiento en plantas de frijol, en términos de peso fresco y seco.

P. citrinum

De acuerdo con Khan et al. (2008), *P. citrinum* es un hongo endófito de plantas como soya y trigo, que produce giberelinas y auxinas. Los autores reportan que *P. citrinum* promueve el crecimiento de plantas de arroz mutantes deficientes en la producción de giberelinas, así que la elongación de los tallos de las plantas se le atribuyó al efecto de las giberelinas exógenas producidas por el hongo *P. citrinum*.

Kuramata et al., (2007) aislaron por primera vez los compuestos llamados citrinolactonas A, B y C y esclerotinina C, dentro de los metabolitos producidos por *P. citrinum*. Estos actúan como reguladores del crecimiento vegetal, algunos lo promueven y otros lo inhiben, específicamente las citrinolactona A y la esclerotinina C promueven el crecimiento de la raíz, mientras que la citrinolactona B inhibe completamente el crecimiento radicular de plantas de lechuga.

Por otra parte, Sreevidya et al., (2015) encontraron que en plantas de garbanzo el uso de filtrados obtenidos a partir de cultivos de *P. citrinum*, promueve el crecimiento en cuanto a valores mayores en longitud, peso seco y longitud total. A dicha cepa se le encontró la capacidad de producir sideróforos y ácido indolacético.

Además, Mittal et al., (2008) también probaron el efecto de *P. citrinum* sobre plantas de garbanzo. Hallaron que cepas de *P. citrinum* cuentan con la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico por encima de los 48 $mg*mL^{-1}$ de fosfato soluble. En el caso de la cepa de *P. citrinum* del presente estudio, ésta tuvo un valor de fosfato soluble de 53,763±1,056 $mg*mL^{-1}$, valor que es coincidente con lo reportado por Mittal et al (2008).

Además, las cepas evaluadas por Mittal y colaboradores (2008) contaban con la capacidad de producir AIA entre 6 a 9,8 $mg*mL^{-1}$ mientras que la cepa del presente experimento tuvo un desempeño mayor en la producción de AIA de 39,21±0,572 $mg*mL^{-1}$.

Dentro de los hallazgos de Mittal et al. (2008), está que, aunque *P. citrinum* cuenta con dos mecanismos *in vitro* asociados con la promoción del crecimiento vegetal, una vez se probó en bioensayo con las plantas de garbanzo, no se evidenció la promoción del crecimiento en términos de longitud total, biomasa y número de semillas por planta.

Con respecto a la actividad ACC desaminasa, Yan et al., (2000) encontraron por medio de técnicas genéticas, que *P. citrinum* cuenta con los genes que codifican tanto para la ACC sintasa como la ACC desaminasa. Adicionalmente, *P. citrinum* puede solubilizar potasio, de acuerdo con Kurjogi et al., (2021).

Con respecto a la halotolerancia, de acuerdo con Seevidya et al., (2015), *P. citrinum* crece bien en concentraciones de hasta 15% de NaCl, por lo que puede sobrevivir en ambientes difíciles como suelos salinos o dunas. Por otra parte, Pandey et al., (2007) reportan que *P. citrinum* puede tolerar concentraciones de hasta el 20% de NaCl.

De acuerdo con Hakim y Yuwati, (2020), la formulación de un biofertilizante basado en *P. citrinum* requiere una prueba de patogenicidad en la especie y variedad vegetal de interés, incluyendo la determinación de la concentración del inóculo, formulación ideal y la etapa de crecimiento en la que se debe llevar a cabo de inoculación.

En soya, Khan et al. (2011), encontraron que el área foliar también disminuye a medida que la salinidad aumenta, pero en condiciones de 140 mM, la inoculación de *P. funicolosum* logra mitigar el efecto negativo de la salinidad, de tal manera que el área foliar se mantiene con respecto a las plantas que se encontraban en salinidad 0.

En la presente investigación, para la mayoría de las variables de crecimiento tenidas en cuenta, el grupo de plantas de rábano inoculadas con *P. citrinum* fue el que mostró

mejor desempeño en condiciones de estrés abiótico por salinidad alta a 100 y 200 mM. Similar a lo reportado por Waqas et al., (2015) quienes evaluando los hongos endófitos *A. terreus* y *P. citrinum* en plantas de girasol encontraron que la inoculación de estos dos hongos promovió el crecimiento de las plantas, en términos de diámetro, peso fresco y seco, conductancia estomática y contenido de clorofilas; además, reportaron que los dos hongos mencionados pueden mitigar efectos del estrés biótico, por infección con fitopatógenos.

***Rhodotorula* spp.**

Silamabarasan et al., (2018), aislaron una cepa del género *Rhodotorula* endófita a partir de plantas de remolacha (*Beta vulgaris*) creciendo en suelos ácidos de Chile. Encontraron que dicha cepa tenía la capacidad de vivir en concentraciones altas de NaCl y de producir exopolisacáridos en dichas condiciones. Los autores midieron la capacidad *in vitro* de *Rhodotorula* spp como solubilizadora de fosfatos, productora de AIA, productora de sideróforos y su actividad ACC desaminasa, en cuatro diferentes condiciones de salinidad, 0, 50, 100 y 150 mM de NaCl. Determinaron que en condiciones no salinas la cepa del género *Rhodotorula*, solubiliza 96,6 µg mL^{-1} de PO_4, produce 74,25 µg mL^{-1} de AIA, y tiene una actividad ACC desaminasa de aproximadamente 20 µm α-CB* mg^{-1}proteina* h^{-1}.

En el caso del aislamiento de *Rhodotorula* evaluado en el presente estudio, solubiliza 56,782 µg mL^{-1} de PO_4, un valor menor que la cepa de Silamabarasan et al., (2019); produce 88,04±0,615 de AIA, un valor un poco mayor al de la cepa reportada en literatura; y con respecto a la actividad ACC desminasa, fue de 9,161 nm α-CB*mg^{-1}*h^{-1}, es decir, la actividad ACCD del aislamiento evaluado en el presente estudio es menor que la de la cepa reportada por los autores anteriormente mencionados.

Sin embargo, en general, tanto las cepas de Silamabarasan et al. (2019), y el aislamiento del presente estudio, cuentan con buena capacidad solubilizadora de fosfatos y productora de AIA; y en cuanto a la actividad ACC desaminasa ninguna de las dos cepas es excepcionalmente buena en esta actividad, ya que se considera una actividad alta solo a partir de 20 nm α-CB*mg^{-1}*h^{-1}.

A pesar de esto, Penrose y glick (2003) mencionan que una alta actividad ACC desaminasa no está estrictamente relacionada con la promoción del crecimiento vegetal. Es decir, que no necesariamente una baja actividad ACC desaminasa se relaciona con un bajo efecto sobre la promoción del crecimiento, ya que depende de la combinación de mecanismos con los que cuente en el microorganismo para que pueda ser considerado promotor del crecimiento vegetal.

Por otra parte, especies de *Rhodotorula* spp. pueden solubilizar potasio a partir de rocas de muscovita, de acuerdo con Mohamed et al., (2016). Los autores concluyen que la levadura se podría utilizar para producir biofertilizantes de K, más económicos que los fertilizantes químicos de cloruro de potasio.

Silambarasan et al., (2018), encontraron en una cepa de *Rhodotorula* que, en condiciones de 50, 100 y 150 mM de NaCl no hay diferencias significativas en cuanto a su desempeño en la producción de AIA, solubilización de fosfatos y actividad ACC desaminasa, es decir, que la salinidad no afecta sus resultados en los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal mencionados.

Un año después, en 2019, Silambarasan et al., identificaron a la cepa como *Rhodotorula mucilaginosa*, y evaluaron el efecto de la inoculación en la promoción del crecimiento de lechuga (*Letuca sativa*), sometida a estrés abiótico por salinidad, déficit hídrico y por exceso aluminio. Encontraron que la inoculación con *R. mucilaginosa* mitigaba el estrés abiótico en términos de longitud de los tallos y raíces, peso fresco y peso seco, contenido de clorofilas y carotenoides, ya que las plantas inoculadas presentaron mayores niveles de pigmentos en comparación con las plantas no inoculadas en condiciones de salinidad a 150 mM de NaCl. Los autores mencionan que los exopolisacáridos producidos por la levadura pueden mitigar el estrés por salinidad, ya que estos polímeros están en la capacidad de capturar el sodio del ambiente y de esa forma reducir la concentración de iones Na+ que en exceso pueden generar toxicidad a las plantas.

Por otro lado, Mundra *et al.*, (2011) reportan que especies de *Rhodotorula* aisladas de suelos salinos de la región del Himalaya, pueden promover el crecimiento de

plantas de tomate en términos de longitud área y radicular, incrementando la productividad en un 3% en comparación con las plantas no inoculadas.

EFECTOS SOBRE EL DIÁMETRO DEL TUBÉRCULO DE RÁBANO

Los efectos de la salinidad sobre las plantas de rábano fueron similares a los reportados por Marcelis y Van (1999) en donde por las condiciones de salinidad las plantas de rábano presentaron un tamaño reducido del tubérculo, pero aun así desarrollaron tubérculo a pesar del estrés por salinidad; los autores encontraron que altas concentraciones de NaCl pueden ser estimulantes tempranos para la formación del tubérculo, pero que finalmente si se mantienen por un período prolongado afectan la productividad en general.

En los resultados obtenidos en el presente estudio, el diámetro de las plantas de rábano sometidas a salinidad 100 y 200 mM de NaCl es significativamente menor que el de las plantas control. Además, las plantas inoculadas tuvieron mayores diámetros que las no inoculadas, pero el grupo de inoculadas con *P. citrinum* fueron las que presentaron mayores diámetros en condiciones de salinidad.

EFECTOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS

En la presente investigación se encontró que a medida que aumenta la salinidad disminuye tanto el porcentaje de germinación, como la longitud de las plántulas, y por lo tanto el índice vigor. Similar a lo reportado por Jamil et al., (2007) quienes reportaron que en rábano la salinidad disminuye drásticamente el porcentaje de germinación de 100% a 60%.

La salinidad afecta la germinación debido a que interfiere con la toma de agua por parte de la semilla, generando un desbalance osmótico que afecta los procesos celulares, como la movilización de reservas. Por lo que, en la mayoría de las especies vegetales, el porcentaje de germinación disminuye cuando la salinidad aumenta (Hadas, 1977). Además, la salinidad inhibe la germinación por medio de la interferencia que causa en la actividad enzimática de las alfa y beta amilasas y la alfa glucosidasa (Sidari et al., 2008).

Aspergillus

De acuerdo con los autores Mathur et al., (2022) la inoculación de filtrado obtenido a partir de *A. niger* mejora el porcentaje de germinación de semillas de *Albizia Lebbeck* y aumenta significativamente en índice de vigor de 834 en las plantas control a 1498 en las plantas inoculadas. Los autores obtuvieron el perfil metabolómico del inóculo y detectaron variedad en tipos de giberelinas, a las cuales le atribuyen el efecto sobre la germinación.

Adicionalmente, Shinde et al., (2020) reportan un aumento en la germinación de semillas de maíz por medio del uso de filtrados de *A. flavus* libres de células, los autores atribuyen el aumento en el porcentaje de germinación, a las nanopartículas de hidróxido de magnesio producidas por el hongo, ya que estas podrían estar asociadas con la ruptura de dormancia.

En contraste, se ha registrado que en el caso de semillas de arroz la inoculación con hongos del género *Aspergillus*, específicamente, *A. flavus, A. niger A. oryzae* y A. *fumigatus*, disminuye el porcentaje de germinación y la longitud, en comparación con el control, por lo que se considera que tienen un efecto inhibitorio (Perrone y Gallo, 2016).

Los autores Islam et al., (2012) mencionan que la eficiencia de la inhibición de la germinación en algunas plantas, ocasionada por hongos del género *Aspergillus*, se debe a las micotoxinas que producen, y esto depende directamente de la concentración del inóculo y de la forma de inocularlo, ya sea directamente en la semilla o en el suelo.

En el caso de las plantas de rábano evaluadas en la presente investigación, la inoculación con dos hongos de los géneros *Aspergillus* generó principalmente efectos negativos o inhibitorios en condiciones de salinidad 0 y 100 mM, pero mostró resultados positivos en cuanto al índice de vigor cuando el tratamiento de salinidad se aumentó de 200 mM. Esto se relaciona con lo mencionado anteriormente, con respecto a la actividad promotora o inhibitoria de un mismo hongo dependiendo de la concentración que se aplique, la especie de planta, y los factores fisicoquímicos en los que tiene lugar la interacción hongo-planta, ya que esto es lo que finalmente es

determinante para que un mismo hongo pueda actuar como fitopatógeno o como promotor. En este caso los hongos del género *Aspergillus* en condiciones de 0 y 100 mM actuaron como inhibidores de la germinación en rábano, pero en 200 mM de NaCl actuaron como promotores.

Penicillium

De acuerdo con Mustaq et al., (2012) la inoculación de semillas de tomate con *P. citrinum* aumenta el porcentaje de germinación y la longitud de las plántulas, es decir, aumenta el vigor, en condiciones no salinas. Para el caso del presente estudio *P. citrinum* promueve la elongación de las plántulas de rábano en condiciones no salinas, pero no aumenta el porcentaje de germinación con respecto al control; sin embargo, en términos del vigor de las plántulas, la inoculación de *P. citrinum* tiene un efecto positivo.

Khan et al., (2011) mencionan que la inoculación con *P. funiculosum* promueve la germinación en un 40% en semillas de soya de bajo condiciones de estrés salino a 70 y 140 mM, y este efecto lo atribuyen a las giberelinas producidas por el hongo.

Por otra parte, Murali et al., (2012) reportan que, en una planta gramínea, el mijo perlado, la inoculación con *Penicillium chrysogenum* en concentración de $1x10^8$ esporas por mL durante 6 horas, aumentó la germinación de las semillas de 9,8 en el control a 89% en las semillas tratadas. Además, las semillas de mijo inoculadas presentaron un índice de vigor significativamente mayor que las que no lo estaban.

Rhodotorula

De acuerdo con Gaballah y Gomaa (2004) la inoculación de semillas de frijol con *Rhodotorula* spp. en condiciones de salinidad, aumenta el porcentaje de germinación. Además, Ghilardi et al., (2020) mencionan que la inoculación con *R. mucilaginosa* genera un aumento en el porcentaje de germinación de semillas de lechuga. Tapia et al., (2020) también reportan que la inoculación con *Rhodotorula* spp. acelera la germinación de semillas de tomate, ya que en el día 14, 80% de las semillas inoculadas habían germinado, mientras que el porcentaje de germinación de las no inoculadas ese mismo día estaba en un 59%.

Gomaa et al., (2005) inocularon semillas de maíz con *Rhodotorula glutinis* y evaluaron el porcentaje de germinación en condiciones de salinidad. Encontraron que la inoculación con esta levadura mejora el porcentaje de germinación bajo condiciones de estrés salino. En el caso de la mostaza de hoja, *Brassica juncea*, Ramos et al. (2016) afirman que el aumento en el porcentaje de germinación y longitud de las plántulas se debe al efecto del ácido indolacético producido por *Rhodotorula mucilaginosa.*

Para las semillas de rábano del presente estudio, en condiciones de salinidad 200 mM de NaCl, la inoculación con *Rhodotorula* spp. tiene efectos positivos sobre el porcentaje de germinación con respecto a las semillas no inoculadas. Pero en condiciones de 0 mM y 100 mM, la inoculación con este hongo no favorece el porcentaje de germinación ni el vigor, a la concentración de $1x10^6$ células/mL. Lo que sugiere que probablemente hay que realizar un ajuste a la concentración para saber si este aislamiento del género *Rhodotorula* puede actuar como estimulante de la germinación en condiciones no salinas.

EFECTO EN LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA A

Cambios en la fluorescencia de la clorofila a se han usado recientemente como indicadores del daño del aparato fotosintético como resultado de diferentes tipos de estrés, por ejemplo, por déficit hídrico, salinidad, metales pesados y por temperatura (Venkatesh et al., 2012).

La disminución del valor Fv/Fm está relacionada con el proceso de fotoinhibición en condiciones de estrés (Liu et al., 2014). En el caso de las plantas de rábano evaluadas en el presente estudio, la disminución en el valor de Fv/Fm es leve, en condiciones de 0 mM fue de 0,84, en 100 mM de 0,81 y en 200 Mm de 0,79, para las plantas no inoculadas, a pesar de que se consideran significativas las diferencias entre los valores mencionados, en la literatura se reporta que se consideran valores normales de Fv/Fm superiores a 0,7 – 0,83 (Maxwell y Johnson, 2000). Por lo que basándose solo en esta variable se podría interpretar que las plantas de rábano son tolerantes a salinidad a 100 y 200 mM, tanto las inoculadas como las no inoculadas, no hay daño en el PSII, ni tampoco estrés; sin embargo, en las demás variables

relacionadas con crecimiento vegetal si hay un efecto de estrés por salinidad. Por lo que no se puede utilizar el parámetro Fv/Fm como único indicador de estrés o no estrés.

Igualmente, de acuerdo con Netondo et al., (2004) la variable Fv/Fm podría no ser un buen indicador del estrés por salinidad, ya que, dependiendo de la especie vegetal, puede que el aumento en la salinidad no genere cambios en la eficiencia fotoquímica del PSII, como se ha encontrado que ocurre en plantas de sorgo. En el presente caso, con plantas de rábano, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los tratamientos 100 y 200 mM en Fv/Fm, pero el valor nunca fue menor a 0,7 que llevan a fotoinhibición.

La reducción en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II y en el PIabs o índice de vitalidad de la muestra se reporta está asociado con el cierre de estomas, disminución en la conductancia estomática (Dionisio y Tobita, 2000). En la matriz de correlaciones (Figura 3) podemos observar que efectivamente las variables Fv/Fm y conductancia estomática, están altamente correlacionadas, con coeficiente de 0,80, ya que estas dos variables disminuyen a medida que la salinidad aumenta, en plantas de rábano.

En plantas de avena, la fluorescencia de la clorofila a también se ve afectada por la salinidad. Zhao et al., (2007) utilizaron plantas de avena sometidas a concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200, and 250 m*M* NaCl, para evaluar el efecto de la salinidad sobre la conductancia estomática y la fluorescencia. Encontraron que igualmente, tanto la conductancia como Fv/Fm disminuyen a medida que la salinidad aumenta, por lo que puede decirse que el efecto sobre el fotosistema II está asociado con un cierre de estomas, el cual disminuye el trabajo fotoquímico. Lo cual sugiere que el efecto de la salinidad en el cierre de estomas es la principal razón que puede estar asociada con la disminución de la eficiencia de la fotosíntesis (Sharma y Hall, 1991).

Para complementar la información sobre la fluorescencia de la clorofila, se tuvo en cuenta también el PI_{abs} o índice de vitalidad de la muestra, que es una variable multicomponente derivada de las curvas de inducción de la clorofila. Este índice combina los tres pasos principales de la fase dependiente de la luz de la fotosíntesis:

absorción de energía lumínica, atrapamiento de la energía de excitación y conversión de la energía de excitación en transporte de electrones (Strasser et al., 2004).

El PIabs en las plantas de rábano, siguió la misma tendencia de disminución a medida que la salinidad aumenta entre 0, 100 y 200 mM.

De acuerdo con Li et al. (2014), hongos endófitos pueden potenciar la actividad fotosintética de plantas de arroz sometidas a estrés por salinidad. Los autores tomaron en cuenta parámetros OJIP de la fluorescencia y midieron los índices de desempeño PI_{abs} y PI_{total}. Concluyen que la inoculación de hongos endófitos mejora el mecanismo fotosintético de *Oryza sativa* en condiciones de estrés por salinidad, ya que los índices de desempeño disminuyen a medida que la salinidad aumenta, sin embargo, la inoculación con el endófito permitió que tanto el PIabs como el Pi_{total} fuera mayor que el de las plantas no inoculadas.

Varios autores reportan una correlación positiva entre los índices de desempeño y parámetros fisiológicos de crecimiento en plantas estresadas, por lo que se consideran buenos indicadores del estrés abiótico (Zushi et al. 2012, Venkatesh et al. 2012).

Jafarinia et al., (2012) mencionan que el PIabs es lo suficientemente sensible para detectar los efectos diferenciales entre tratamientos de sal de 100 y 200 mM en plantas de canola (*Brassica napus*). Donde el incremento de la concentración de NaCl trae consigo una disminución del PIabs, al igual que los resultados encontrados para rábano en el presente estudio.

EFECTO EN EL CONTENIDO DE CLOROFILAS Y CAROTENOIDES

Jamil et al., (2007) mencionan que las plantas de rábano en condiciones de salinidad presentan reducción en el contenido de clorofilas, área foliar y fluorescencia de la clorofila. Además, las plantas de rábano en condiciones de estrés abiótico también presentan disminución en el contenido de carotenoides (Beltagi et al., 2010; Callejas 2013).

Penicillium

P. citrinum puede mitigar el estrés en plantas de girasol (Waqas et al., 2015). En cuanto al contenido de clorofilas y a la conductancia estomática, la inoculación con este hongo en plantas de girasol, mejora significativamente el desempeño de las plantas en estas dos variables, en condiciones de estrés biótico por infección de un fitopatógeno, en comparación con las plantas no inoculadas.

Khan et al. (2011), mencionan que, en plantas de soya, el contenido de clorofilas disminuye a medida que aumenta la salinidad entre 0, 70 y 140 mM; sin embargo, la inoculación con el hongo *P. funicolusum* genera que esa disminución del contenido sea menos drástica. Los resultados expuestos por Elgharably et al., (2021) en plantas de trigo en condiciones de salinidad, 0, 75 y 150 mM de NaCl, inoculadas con *P. funicolosum* coinciden con lo reportado por Khan et al., (2011), en cuanto a la mitigación del estrés abiótico, por un aumento del contenido de clorofilas en comparación con las plantas no inoculadas. Los niveles de carotenoides en las plantas de trigo también disminuyeron con el aumento de la salinidad, pero la inoculación evitó que la disminución fuera tan drástica como en las no inoculadas.

Aspergillus

Khushdil et al., (2019) encontraron que la inoculación de plantas de *Pennisetum glaucum* con el hongo endófito *A. terreus*, en condiciones de salinidad 100 mM de NaCl, mitiga los efectos de estrés abiótico sobre el crecimiento y contenido de clorofilas. El efecto mitigador se le atribuyó a la alta producción de AIA por parte del hongo, en condiciones salinas.

Además, plantas de trigo bajo condiciones de salinidad inoculadas con *A. terreus* presentan mejores valores en el contenido de clorofilas, en comparación con las no inoculadas, ya que el contenido de clorofilas disminuyó significativamente a medida que la salinidad aumentó entre 0,60, 120 y 180 mM de NaCl. En cuanto al contenido de carotenoides, la inoculación también favoreció que la disminución que tiene lugar con el aumento de la salinidad, fuera menos drástica (Khan et al., 2022).

En contraste, Lubna et al. (2018), reportan que en soya el contenido de clorofilas tras la inoculación *de A. flavus,* no mostró diferencias significativas en ninguno de los tratamientos de salinidad a 150, 300 y 400 mM.

Rhodotorula

Silambarasan et al., 2022, encontraron que la inoculación con *R. mucilaginosa* en plantas de espinaca aumenta el contenido de clorofilas totales, en condiciones de estrés por salinidad y déficit hídrico.

La disminución del contenido de clorofila en condiciones de salinidad se debe probablemente a la aceleración de la degradación de estos pigmentos o a la inhibición de su síntesis. La degradación es llevada a cabo por la enzima clorofilasa, aparentemente las altas concentraciones de NaCl inducen la actividad de esta enzima (Ali et al., 2021; Cheng et al., 2016).

EFECTO EN EL CONTENIDO DE PROLINA

En condiciones de salinidad, se genera el efecto de déficit hídrico, por lo tanto, ocurre el cierre de estomas para evitar la pérdida de agua por transpiración, y como consecuencia hay una menor entrada de CO_2, y por consiguiente una disminución de la tasa fotosintética (Yang et al., 1984). Esto genera que el proceso de fijación de carbono disminuya, así que el NAD(P)H se acumula y señaliza la producción y acumulación de ROS.

Sin embargo, el metabolismo de la prolina tiene un papel importante en la vía oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP) debido a la generación de NAD(P)+. Durante la biosíntesis de prolina se requiere el uso de 2 moléculas de NADP(H), las cuales son oxidadas a NAD(P)+, ésta último entra a la vía OPPP, en la cual se produce CO_2. Así que el CO_2 generado puede ser utilizado en los cloroplastos para llevar a cabo el ciclo de Calvin, para continuar este proceso en condiciones de estrés por déficit hídrico, aun cuando los estomas se encuentren cerrados (Verslues, 2010; Signorelli, 2016).

Existen reportes contrastantes con respecto a la interpretación del contenido de prolina en condiciones de estrés por salinidad y/o déficit hídrico. Ya que hay autores

que reportan que un aumento en los niveles de prolina es un indicador de tolerancia al estrés, debido que la prolina actúa como un osmoprotectante. Sin embargo, otros autores en distintas plantas inoculadas con microorganismos promotores del crecimiento han encontrado que la inoculación disminuye los niveles de prolina en condiciones de estrés en comparación con las plantas no inoculadas, y lo interpretan como un efecto de mitigación por parte de los microorganismos.

Por ejemplo, Moukhtari et al. (2020) a través de una revisión de literatura, sustentan que la aplicación exógena de prolina tiene un efecto de mitigación de estrés por salinidad. Ya que bajo condiciones de salinidad la aplicación de prolina promueve el crecimiento, incrementa el porcentaje de germinación y la tasa fotosintética. Por lo que afirman que esto se debe al efecto de la prolina en el mejoramiento nutricional de la planta y en la señalización de activación de mecanismos antioxidantes, y que el aumento en los niveles de prolina es un signo de tolerancia al estrés por salinidad.

Dentro de esa misma línea, Abdel et al., (2003) reportan que, en condiciones de salinidad, la aplicación exógena de prolina a 5 mM en solución nutritiva para el crecimiento de plántulas de *Pancratium maritum*, aumenta los niveles internos de prolina en tallos y raíces, en condiciones de 150 y 300 mM de NaCl. Además, la aplicación exógena de prolina promovía el crecimiento en condiciones salinas, por lo que los autores consideran que el aumento en el contenido de prolina es un signo de tolerancia estrés por salinidad.

Por el contrario, Boscaiu et al. (2013), mencionan que el aumento de prolina es un signo de la sensibilidad al estrés por déficit hídrico y no de tolerancia. Liu y Kang (1997) encontraron en *Arabidopsis thaliana*, que los ecotipos más sensibles al estrés por salinidad presentaban mayores niveles de prolina, que aquellos considerados tolerantes. Además, concluyen que los datos son los suficientemente robustos para afirmar que la acumulación de prolina es un síntoma de estrés por salinidad más que un indicador de tolerancia.

En contraste, Meddiche et al. (2007) mencionan que las plantas halófitas tienden a acumular más prolinas que las plantas glicófitas, por lo que la acumulación de prolina se debería considerar como un indicador de tolerancia al estrés por salinidad, debido

a la importancia de este aminoácido en el ajuste osmótico y en la protección de la estabilidad de la membrana en condiciones de salinidad severa.

Con respecto a los microorganismos señalados como mitigadores de estrés por salinidad, en general, se considera que éstos reducen los niveles de prolina en comparación con las plantas no inoculadas.

Por ejemplo, Muthukumarasamy et al., (2000) encontraron que plantas de rábano expuestas a 80 mM de NaCl, presentan un incremento en los niveles de prolina. Además, la actividad de la enzima prolin-oxidasa disminuye, lo cual está inversamente relacionado con el aumento en los niveles de prolina, ya que la inhibición de la oxidación de la prolina determina su acumulación. Sin embargo, la aplicación de sustancias como el Triademefon pueden disminuir los niveles de prolina en condiciones de salinidad, lo que ellos interpretan como un efecto de mitigación del estrés.

Además, Kasim et al., (2016) hallaron que, en plantas de rábano, a medida que aumenta la salinidad entre 0, 250 y 200 mM de NaCl, el contenido de prolina aumenta significativamente, ya que en 0 mM el contenido de prolina era de alrededor de 25, en 150 de 40 y en 200 de aproximadamente 50. Adicionalmente, los autores reportan que el tratamiento de las semillas de rábano con extractos de algas, en condiciones de 150 y 200 mM, tiene como efecto un aumento menos severo del contenido de prolina en esas condiciones de sal.

Aspergillus

La inoculación de *A*. *ochraceus*, un hongo endófito, en plantas de cebada bajo condiciones de salinidad, mitiga los efectos de estrés en cuanto crecimiento, contenido de clorofilas y de prolina. Las plantas no inoculadas regadas con agua de mar presentaron mayores valores de prolina en comparación con las que fueron inoculadas con el hongo. Además, encontraron que las plantas inoculadas tenían mayores niveles de actividad de las enzimas: superóxido dismutasa, peroxidasa y fenol oxidasa, además de reducir los niveles de peróxido de hidrógeno y malondialdehído (Badawy et al., 2021).

Además, *A. flavus* en plantas de soya bajo condiciones de salinidad, también promueve la actividad de las enzimas SOD, PPO y POD en comparación con las plantas no inoculadas (Asaf et al., 2018). Por otra parte, la inoculación con *A. awamori* en plantas de frijol, también redujo los niveles de prolina en condiciones salinas a 150 mM, en contraste con las plantas no inoculadas (Ali et al., 2021).

Penicillium

Las plantas de rábano del presente estudio, inoculadas con *P. citrinum* tuvieron valores significativamente menores de prolina con respecto a las plantas no inoculadas, en condiciones de salinidad 100 y 200 Mm.

Elgarably et al. (2021) reportan que la inoculación con *P. funicolosum* en conjunto con, en plantas de trigo sometidas a estrés por salinidad, ocasiona que el aumento en los niveles de prolina a medida que aumenta la salinidad sea menos riguroso en comparación con las plantas que no fueron inoculadas.

Rhodotorula

En el caso de las plantas de rábano del presente estudio, la inoculación con *Rhodotorula* spp. también generó una disminución de los niveles de prolina en las plantas sometidas a estrés por salinidad a 100 y 200 Mm de NaCl, lo cual concuerda con lo reportado por Silamabarasan et al., (2018) para plantas de lechuga, y por Gaballah y Gomaa (2004) para plantas de fríjol.

Con respecto a los niveles de prolina en plantas de lechuga, los autores Silambarasan et al. (2018) encontraron que los niveles de prolina tienen un aumento significativo cuando las plantas de lechuga se encuentran estrés salino; sin embargo, la inoculación con *R. mucilaginosa* disminuye el contenido de prolina. La inoculación con esta levadura redujo la concentración de prolina entre 50 y 60% en plantas sometidas a estrés abiótico por NaCl a 150 mM. También, mencionan que la disminución de los niveles de prolina es un indicador de la mitigación del estrés abiótico. Además, evaluaron el efecto de la inoculación en la actividad de enzimas catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa; evidenciaron que la inoculación con *R. mucilaginosa* en plantas de lechuga en condiciones de salinidad aumenta la actividad de las tres enzimas mencionadas, en comparación con las plantas no inoculadas.

Gaballa y Gomaa (2004) señalan que, en plantas de frijol, creciendo en condiciones de salinidad, la inoculación con *Rhodotorula* spp. disminuye los niveles de prolina con respecto a las plantas control no inoculadas.

De acuerdo con lo anterior, lo que se puede interpretar sobre los resultados obtenidos en la presente investigación, es que las plantas inoculadas, las cuales presentaron menores niveles de prolina estaban menos estresadas que las no inoculadas; y que en general, hay un aumento en el contenido de prolina de las plantas a medida que la salinidad aumenta; sin embargo, la inoculación con hongos halotolerantes hace que el aumento no sea tan fuerte.

EFECTO EN ESTADO HÍDRICO: CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA Y CHR

CHR

En el presente estudio, se encontró que las plantas de rábano a 100 y 200 mM no presentan una disminución fuerte del contenido hídrico relativo ni del contenido de agua en hojas. Con respecto al CHR, podría ser por la razón que mencionan Lubna et al., (2018), es decir, que es preferible tomar la medida de CHR en hojas completas y no en discos foliares. En cuanto al % de agua en hojas, tanto Jamil et al. (2007) como Kasim et al., (2016) reportan que el contenido de agua en hojas de rábano no se ve afectado significativamente por salinidad alta.

Lubna et al. (2018), reportan que la inoculación con *A. flavus* en plantas de soya, sometidas a tres concentraciones de salinidad 150, 300 y 400 mM de NaCl mejora el CHR en las tres condiciones. En las plantas no inoculadas el CHR disminuye a medida que la salinidad aumenta. Los autores midieron el CHR en las hojas completas, no en discos foliares, para evitar posibles efectos por el corte de la superficie en la salida de solutos, lo cual genera cambios osmóticos y esto interfiere en la medición del CHR.

Por otra parte, Yildirim et al. (2008), encontraron que al inocular rizobacterias en plantas de rábano, el CHR en condiciones de salinidad 100 mM, éste aumenta con respecto a las plantas no inoculadas en las mismas concentraciones de sal. La metodología que emplearon los autores la realizaron utilizando la hoja completa y no discos foliares.

En contraste, Jamil et al., (2007) encontraron que el CHR y el contenido de agua en hojas de rábano no se ven afectados por el aumento en la salinidad. Asimismo, Kasim et al., (2016) también reportan que el contenido de agua en hojas de plantas de rábano sometidas a 150 y 200 mM de NaCl no disminuye drásticamente.

La disminución poco drástica del CHR en hojas de rábano podría estar relacionado con el efecto de la salinidad sobre la resistencia estomática, ya que en condiciones de salinidad las plantas de rábano aumentan su resistencia estomática, es decir, cierran estomas, por lo que en las hojas no disminuye tanto el contenido hídrico.

CONDUCTANCIA ESTOMATICA

De acuerdo con los resultados obtenidos, la conductancia en plantas de rábano sometidas a estrés por salinidad, a 100 y 200 mM de NaCl, disminuye significativamente con respecto a las plantas en salinidad 0. Olivera et al. (2020) también mencionan que la conductancia estomática en rábano disminuye bajo condiciones de estrés por exceso de amonio.

En soya, Khan et al. (2011), reportan que la conductancia disminuye a medida que la salinidad aumenta; sin embargo, la inoculación con *P. funiculatum* reduce el efecto, ya que la conductancia tiene una disminución suave, en comparación con las plantas no inoculadas.

Por otra parte, Salazar et al., (2022) encontraron que, en plantas de rábano en condiciones de estrés por anegación, la conductancia estomática decrece, en respuesta al estrés abiótico. Sin embargo, la inoculación con la bacteria *Azospirillum brasiliense* permite que las plantas inoculadas tengan valores mayores de conductancia, en comparación con las plantas control.

Los autores Marcelis y Van (1999) analizaron el efecto de la salinidad sobre la conductancia estomática y tasa fotosintética de plantas de rábano. Encontraron que la disminución en la tasa fotosintética está asociada en un 20% con la caída de los valores de conductancia estomática, y el otro 80% de la disminución en la tasa es

explicado por la disminución en el área foliar del dosel de la planta, y por lo tanto en el área receptora de luz.

ANÁLISIS GENERAL
EFECTO DE LA INOCULACIÓN SOBRE LA GERMINACIÓN

En definitiva, lo que se pudo evidenciar es que los efectos de inoculación de los hongos en la germinación *in vitro* de semillas de rábano en condiciones no salinas, el efecto era neutro o incluso negativo en comparación con el control. Para analizar esto se debe tener en cuenta que el medio para germinación fue solo agua destilada, y se llevó a cabo durante 10 días, por lo que, en esas condiciones, como se evidenció, los hongos crecieron sobre las semillas, y probablemente las utilizaron como fuente de alimento, debido a que pasaron 10 días y no se había agregado ningún aditivo de carbono o nitrógeno al medio de germinación. Otra explicación posible, es que la concentración de inóculo ($1x10^6$) haya sido muy alta teniendo en consideración lo mencionado acerca de la escasez de nutrientes en el medio de germinación, por lo que el hongo pudo haber utilizado la única fuente de recursos disponibles para llevar a cabo la germinación de sus esporas y crecimiento, utilizando las semillas como medio.

Se ha reportado que hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicllium* y *Rhodotorula* cuentan con la enzima celulasa (Mrudula et al., 2011; Pi et al., 2018; Gopniath et al., 2005). Para confirmarlo se evaluó la actividad celulolítica de los hongos, y se encontró que los 4 cuentan con la capacidad de degradar la celulosa. Siendo *A. fumigatus* el hongo que creció más rápido en el medio con CM-celulosa como fuente de carbono, y el que luego mostró el efecto negativo más fuerte sobre la germinación de las semillas de rábano, por lo que no se descarta que haya una relación entre su actividad como microorganismo celulolítico y su desempeño en el ensayo de germinación *in vitro*, teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente con respecto al medio de germinación utilizado. Pero, como al aumentar la salinidad el hongo ya no presentó efectos negativos, sería interesante evaluar si la actividad celulolítica de estos hongos disminuye a medida que la salinidad aumenta, para saber si el cambio de efecto se debe a esta razón.

Una vez cambiaron las condiciones de salinidad a 200 mM, los hongos se comportaron de forma diferente ya que en dichas condiciones los cuatro hongos causaron un efecto positivo sobre el vigor de las plántulas de rábano *in vitro*. Esto puede ser debido a que la concentración de NaCl actuará como un estimulante de las actividades de producción de auxinas y actividad ACC desaminasa por parte de los hongos; pero debido también a las condiciones de salinidad el crecimiento del hongo es más lento por lo que no utilizó tan rápidamente los recursos de las semillas y estás alcanzaron a germinar. Debido a que, en condiciones no salinas, el hongo colonizó rápidamente varias de las semillas, alrededor del día 4, y como se mencionó, las semillas que eran totalmente rodeadas por el hongo ya no germinaban; pero en condiciones no salinas el hongo creció más despacio y no alcanzó a colonizar totalmente las semillas, esto favoreció el aumento del porcentaje de germinación de las plántulas hasta el día 10. Aunque este efecto no se debe solo a que el hongo creciera más lento, sino también porque las plántulas de las semillas no inoculadas en condiciones de 200 mM presentaron menores valores de longitud que las que si fueron inoculadas. Entonces, se podría pensar que, por un lado, la salinidad favoreció que el crecimiento del hongo fuera más lento y por lo tanto no utilizara las semillas como fuente de nutrientes tan rápidamente; y por el otro lado, el hongo tuvo realmente un efecto estimulador, ya que las plántulas obtenidas a partir de las semillas inoculadas tenían una longitud significativamente mayor que las que no lo estaban en condiciones de 200 mM.

Teniendo en cuenta que los hongos son organismos heterótrofos, en un medio en el que no se ha adicionado ninguna fuente de C y N, solo agua destilada, es plausible considerar que por esta razón los hongos hayan tenido un efecto negativo sobre las semillas. Sin embargo, una vez el hongo se ve enfrentado a un estímulo por salinidad, teniendo en cuenta que los cuatro hongos evaluados son halotolerantes y pueden vivir en concentraciones de hasta 500 mM, al verse sometidos a 200 Mm de NaCl crecen pero más lentamente, ya que como se definió anteriormente los microorganismos halotolerantes, como su nombre lo indica, toleran hasta una cierta concentración de NaCl, pero esto no significa que ese nivel máximo de NaCl sea su óptimo de crecimiento, como sí sería el caso de microorganismos halófilos.

Por lo tanto, comparando estos resultados de germinación *in vitro* con los del ensayo en invernadero, teniendo en cuenta que para ambos casos se llevó a cabo la inoculación desde semilla y en la misma concentración de inóculo, la gran diferencia es que en el caso del ensayo *in vitro* el medio de germinación fue solo agua destilada; mientras que para el montaje del bioensayo en invernadero, las semillas fueron inoculadas, y una vez pasadas las tres horas de incubación del conjunto semilla más hongo, inmediatamente se pasaron a suelo. Ya en el suelo las esporas del hongo tenían variedad de recursos para aprovechar en el sustrato sin recurrir a la semilla como fuente de recursos, ya que el suelo que se utilizó tenía un contenido alto de carbono, al provenir de tierra abonada. Por lo que, en condiciones no salinas, en las semillas utilizadas para el bioensayo en suelo, no se evidenció que los hongos generaran algún efecto negativo, sino que, por el contrario, mostraron ser efectivos en la promoción del crecimiento de plantas de rábano.

EFECTO SOBRE CRECIMIENTO Y FISIOLOGÍA

De acuerdo con los resultados de la evaluación *in vitro*, en condiciones no salinas, de tres mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, se encontró que *Rhodotorula* spp. era la que tenía mejor desempeño en los tres mecanismos mencionados, en segundo lugar, *P. citrinum*, en tercero *A. terreus* y en cuarto lugar *A. fumigatus*. Por lo que se esperaba que la inoculación de los hongos generara resultados similares en cuanto a las variables de crecimiento y fisiología.

A pesar de que la inoculación de los hongos generó efectos positivos, el desempeño en condiciones no salinas mostró que algunos hongos eran mejores en este aspecto. La inoculación que generó más eficiencia en cuanto a promoción del crecimiento fue la de *P. citrinum*, debido a que su efecto promotor se vio reflejado en 6 de las 14 variables evaluadas. Mientras que *Rhodotorula* spp. y *A. terreus*, en segundo lugar, solo promovían el crecimiento en cuanto a 2 de las variables, y *A. fumigatus* en el último lugar, ya que solo mostraba efectos significativos de promoción en una variable.

Rhodotorula spp., a pesar de ser buena productora de AIA y de ser eficiente en la solubilización de fosfato inorgánico, contaba con una baja actividad ACC desaminasa.

Mientras que *P. citrinum* no era el mejor en ninguna de las tres actividades *in vitro;* sin embargo, contaba con las tres, y especialmente con una moderada actividad ACC desaminasa (31,38 nmol α-CB mg^{-1} h^{-1}), no tan baja como la de *Rhodotorula* spp (9,161 nmol α-CB mg^{-1} h^{-1}). Penrose y Glick (2003) mencionan que el hecho de que un microorganismo cuente una alta actividad ACC desaminasa *in vitro*, por encima de 200 nmol α-CB mg^{-1} h^{-1}, no necesariamente indica que promueve el crecimiento una vez se inocula y se prueba en condiciones de invernadero.

En condiciones de salinidad 100 y 200 mM todos los hongos actuaron como mitigadores del estrés por salinidad, de acuerdo con las 14 variables evaluadas. Nuevamente, a pesar de que todos los hongos actuaron como mitigadores, el hongo más eficiente fue *P. citrinum*. Esto puede estar relacionado, además de con la actividad ACC desaminasa, producción de AIA y solubilización de fosfatos, con la producción de varias giberelinas y de sideróforos por parte de este hongo, como lo reportan Khan et al., (2008) y Seevidya et al., (2015).

Por otra parte, en el caso de *Rhodotorula* spp. aunque tiene una actividad ACC desaminasa baja, otro mecanismo que podría estar teniendo lugar durante la mitigación de estrés por salinidad en las plantas de rábano es el de la producción de exopolisacáridos, los cuales pueden secuestrar los iones Na+ (Sorty et al., 2018).

ACTIVIDAD ACC DESAMINASA Y EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO

El único mecanismo de mitigación directa del estrés que se determinó en la presente investigación fue la actividad ACC desaminasa. La relación de los resultados de dicha determinación *in vitro* con lo observado en la evaluación de crecimiento en plantas de rábano está en que los cuatro hongos cuentan con la capacidad de utilizar el sustrato ACC para convertirlo en α- CB y amonio, y por lo tanto pueden reducir los niveles de etileno (Penrose y Glick, 2003).

Esto está asociado a que el aumento excesivo de la fitohormona etileno señaliza la producción de especies reactivas de oxígeno y senescencia en condiciones de estrés abiótico. Un primer pico de esta hormona está asociado a señalización que desencadena la expresión rápida de genes relacionados con la tolerancia al estrés;

sin embargo, un segundo pico tiene como consecuencia la acumulación excesiva de ROS que lleva a la muerte celular (Tao et al., 2015). Se sabe que la señalización mediada por etileno promueve la acumulación de ROS, pero la cascada de señalización del etileno también termina con la expresión de enzimas como SOD, POD, y enzimas productoras de osmolitos como la P5CS (Hsieh et al., 2013). Por lo que se propone en plantas tolerantes a estrés por salinidad, que la producción de etileno se autorregula para mantener la homeostasis de esta hormona, esto debido a su efecto doble, tanto en la producción de ROS como en la producción de enzimas antioxidantes (Hsieh et al., 2013). Así que la producción y señalización por etileno es indispensable para que la planta responda rápidamente a la salinidad, pero en condiciones prolongadas de exposición a la salinidad el exceso de esta fitohormona puede conducir a la muerte de la planta.

Aún no se tiene una conclusión definitiva acerca de si el papel del etileno es positivo o negativo en cuanto a la tolerancia al estrés por salinidad, pero sí se sabe que la actividad ACCD de algunos microorganismos puede mitigar el estrés en plantas mediante la disminución del nivel de etileno, como lo demostraron Brodma et al., (2013) utilizando *Trichoderma* spp. con el gen ACCD silenciado, de esa forma encontraron que el hongo con el gen silenciado no mitigaba el estrés por salinidad, mientras que el silvestre sí lo podía hacer.

Los niveles óptimos de etileno para el desarrollo normal de una planta dependen de la especie y del estado fenológico. Por lo que se propone que una producción inicial de etileno es necesaria para que las plantas respondan al estrés; sin embargo, una vez pasada esa etapa inicial de ajuste a las condiciones de salinidad, un nivel excesivo de etileno inhibe el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cao et al., 2007; Tao et al., 2015).

COLONIZACIÓN DE LA PLANTA POR PARTE DE LOS HONGOS

Hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhodotorula* (Waqas et al. 2015, Firrinecieli et al., 2015) se han reportado como endófitos de plantas. Se cuenta con que los cuatro hongos del presente estudio presentan mecanismos de colonización y de interacción con las plantas de rábano, gracias a los resultados obtenidos, partiendo

de que el suelo en el que se sembraron las semillas fue esterilizado previamente, para reducir la interferencia por otros microorganismos de la rizosfera. Así pues, existe la posibilidad de que los hongos hayan llegado a vivir como endófitos en las plantas de rábano, aunque para el desarrollo de la presente investigación no se evaluó; sin embargo, sería interesante verlo, por ejemplo, mediante imágenes tomadas por microscopía electrónica para determinar si se presentan hifas de los hongos dentro de distintos órganos de la planta, como hojas, tallos y raíces (García et al., 2012).

El hongo *Aspergillus oryzae* se ha aislado como endófito de plantas de rábano, y se ha encontrado que promueve el crecimiento vegetal y además aporta protección ante herbívora por la larva del lepidóptero *Plutella xylostella* (Sun et al., 2018).

EFECTO DEL CONJUNTO DE HONGOS

Como se evaluó el efecto de los cuatro hongos por separado y también de la mezcla de éstos, lo que se pudo ver en cuanto a las variables de crecimiento y fisiología, es que en algunas de ellas actuaron mejor los hongos por separados que en el consorcio. Por lo que se puede decir que el cocultivo de los cuatro hongos no tuvo un efecto sinérgico, ya que en general, el efecto de la inoculación de los hongos fue mejor cuando se aplicaban individualmente.

Esto se puede deber a que entre los hongos algunos de ellos inhiban el crecimiento de otros. Por ejemplo, los hongos *A terreus, A. fumigatus P. citrinum in vitro* cuentan con propiedades antifúngicas contra otros hongos como los del género *Fusarium*, *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotium rolfsii* (Ting et al., 2012; Waqas et al., 2015; Boughalleb et al., 2018).

Por otra parte, especies del género *Rhodotorula* pueden ejercer efectos de control biológico sobre los hongos *Penicillium expansum, Penicillium digitatum* y *Botrytis cinerea*, utilizando como mecanismo de control la competencia por nutrientes y espacio (Zhang et al., 2009; Chen et al., 2016; Ahima et al., 2019).

Adicionalmente, las especies *A. terreus, A. fumigatus, P. citrinum y R. mucilaginosa* son productoras de sideróforos, moléculas quelantes de hierro, que constituyen un

rasgo asociado a control biológico a través de la competencia por nutrientes (Waqas et al., 2015; Calvente et al., 2001). Para saber si el efecto evidenciado por la inoculación del consorcio se debe a la inhibición del crecimiento entre unos hongos y otros, se podrían realizar ensayos *in vitro* enfrentando los hongos; y además evaluar la producción de sideróforos en medio CAS (Machuca et al., 2003).

Para finalizar, los resultados sugieren que los cuatro hongos halotolerantes evaluados podrían usarse en la producción de un biofertilizante aplicable a plantas creciendo en suelo salino. Sin embargo, esto debe ser evaluado con detenimiento, ya que algunos de estos hongos pueden ser patógenos humanos o incluso fitopatógenos de algunas especies de plantas, por lo que una formulación adecuada en cuanto a bioseguridad de la aplicación es necesaria. Así que, se debe tener en consideración la concentración de esporas ideal, o si es más recomendable usar filtrados libres de esporas. Primero se debe realizar un ensayo para confirmar que la interacción planta hongo sea benéfica, ya que esto puede variar dependiendo de la especie de planta; es por esto que un mismo microorganismo puede ser reportado tanto como promotor de crecimiento en una especie y como fitopatógeno en otra. Además, la forma de inoculación puede ser determinante de la efectividad, ya sea en semilla o en raíces de las plántulas. También, se debe determinar la periodicidad de inoculación, para evitar cualquier efecto negativo y potenciar el impacto positivo que se demostró que tienen estos hongos sobre el crecimiento vegetal en condiciones de estrés abiótico.

Como recomendaciones finales, se tienen la evaluación *in vitro* de tres mecanismos adicionales de promoción del crecimiento vegetal, la solubilización de potasio, la producción de giberelinas y de sideróforos, para complementar los resultados obtenidos en la presente investigación. Además de evaluar dichos mecanismos en diferentes concentraciones de sal, para saber si el aumento en la salinidad tiene un efecto estimulador sobre estos mecanismos, o por el contrario actúa como inhibidor de las actividades mencionadas.

11.CONCLUSIONES

Cuatro hongos halotolerantes, identificados por sus características morfológicas como *A. terreus, A. fumigatus, P. citrinum* y *Rhodotorula* spp.; *in vitro*, cuentan con

mecanismos de promoción del crecimiento como la solubilización de fosfato y la actividad ACC desaminasa. Solo *Rhodotorula* spp y *P. citrinum* evidenciaron producción de AIA.

En condiciones *in vitro*, los hongos generan efectos negativos o neutrales en cuanto a las variables porcentaje de germinación, longitud de las plántulas de rábano y vigor en condiciones no salinas. Sin embargo, al aumentar la salinidad a 200 mM de NaCl, su efecto es positivo sobre las variables anteriormente mencionadas.

Los resultados del bioensayo en invernadero permiten concluir que, en condiciones no salinas, la inoculación de los hongos tiene actividad promotora del crecimiento vegetal y parámetros fisiológicos de las plantas de rábano, siendo *P. citrinum* el que tiene mayor efectividad.

En cuanto a la mitigación del estrés abiótico en condiciones de salinidad 100 y 200 mM, los cuatro hongos cuentan con la capacidad de mitigar el estrés. Teniendo en cuenta el número de variables en las cuales se observa un efecto positivo, *P. citrinum* resultó ser el hongo más efectivo en la moderación del estrés salino en condiciones de invernadero.

El desempeño del consorcio en cuanto a promoción del crecimiento y mitigación de estrés no fue mejor que el de los hongos individuales, por lo que se concluye que la mezcla de los cuatro hongos no tiene un efecto sinérgico positivo sobre las plantas de rábano, lo cual puede deberse a una interacción de antagonismo entre algunos de los hongos.

Los resultados sugieren que los cuatro hongos halotolerantes evaluados podrían usarse en la producción de biofertilizantes para suelos salinos, teniendo en cuenta que como consorcio no tuvieron el efecto esperado, por lo que se debe buscar la forma más eficiente de inoculación.

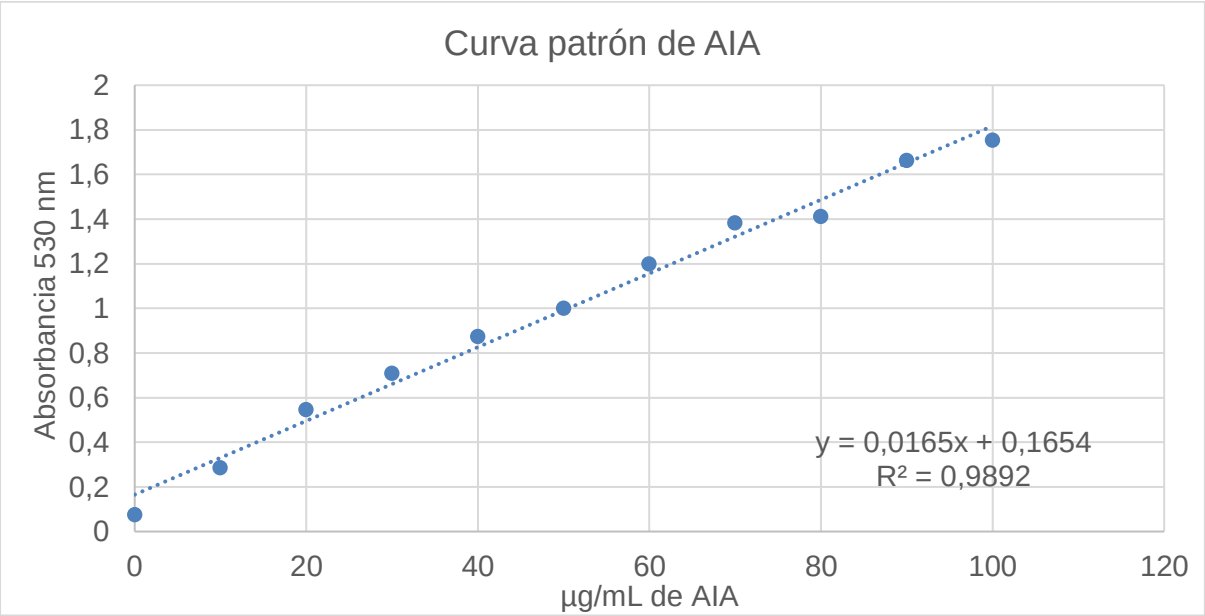
8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda para una futura investigación, probar *in vitro* los mecanismos de promoción del crecimiento en diferentes concentraciones de sal para saber si el desempeño se ve afectado positiva o negativamente de forma significativa por el cambio de distintos factores fisicoquímicos.
- Para obtener un panorama más completo sobre el papel de la prolina en condiciones de estrés por salinidad y cómo interpretar su aumento o disminución; surge como sugerencia, realizar determinación del contenido de otros osmolitos como glicina-betaína y azúcares totales, y también la actividad de enzimas antioxidantes, como catalasa, peroxidasas y superóxido dismutasa.
- Evaluar por medio de microscopía electrónica la interacción física entre los hongos y las plantas de rábano, para determinar si éstos logaron colonizar estructuras vegetales, como raíces o incluso tallos y hojas, convirtiéndose en endófitos.

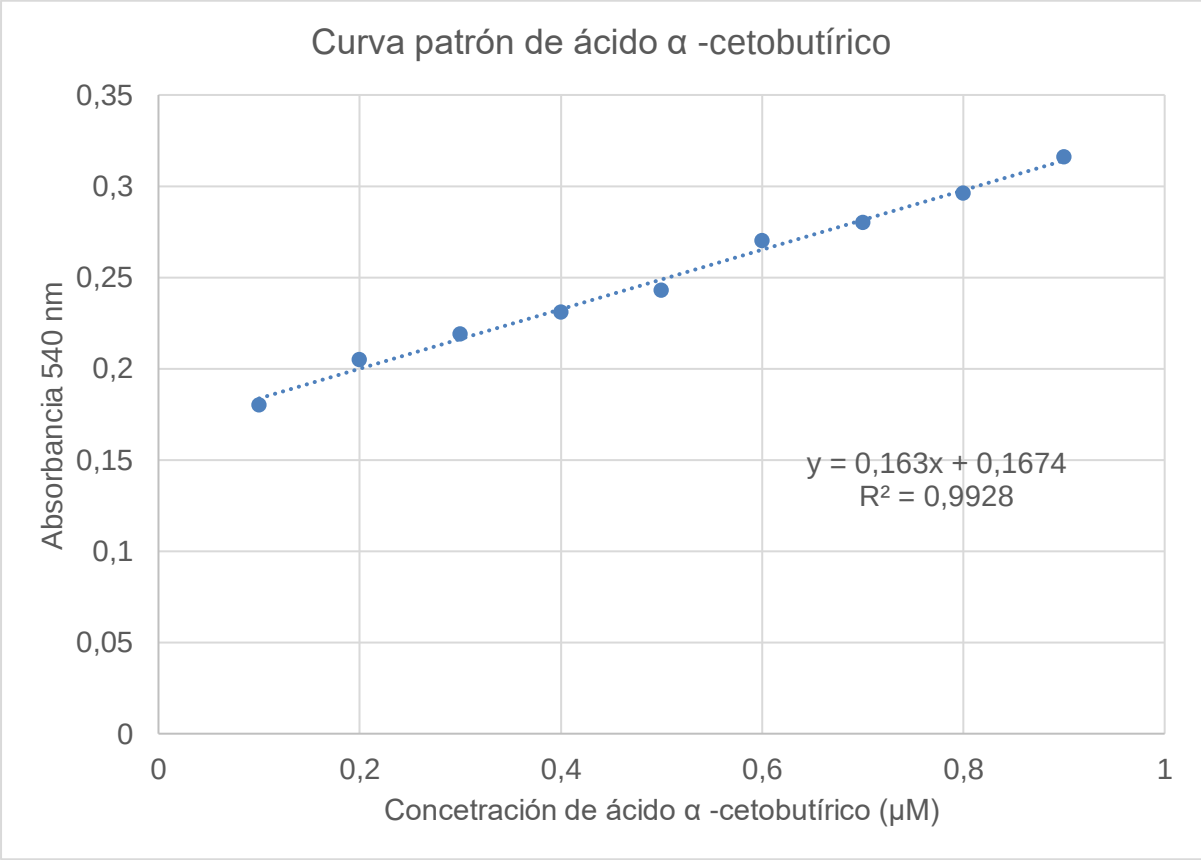
9. **ANEXOS**

CURVAS DE CALIBRACIÓN

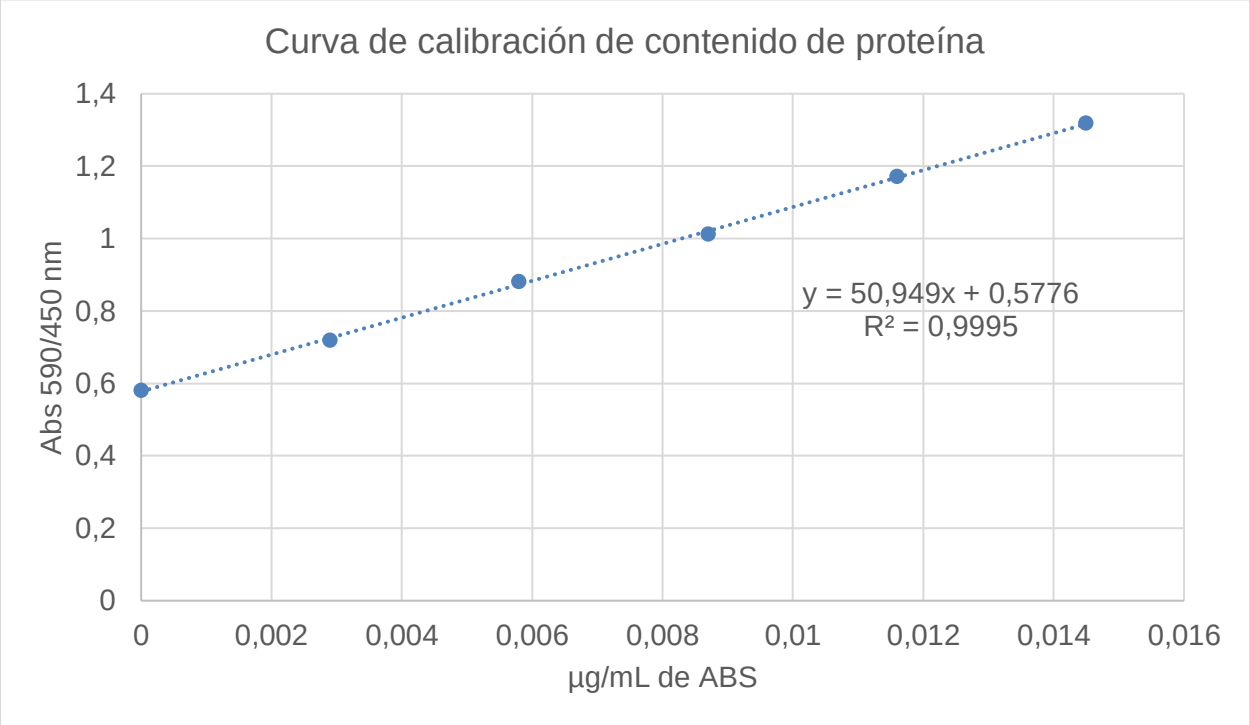
1.Curva patrón de AIA



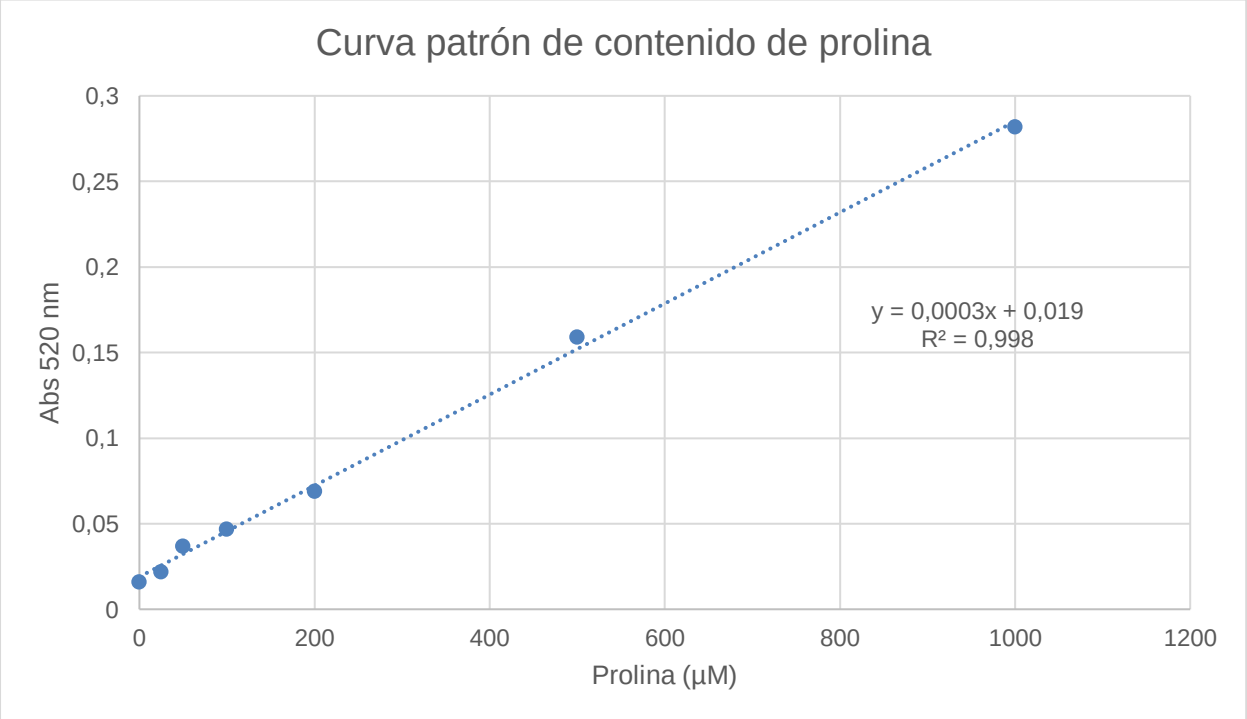
1. Curva patrón de α-CB



3. Curva patrón de cuantificación de proteínas



4. Curva patrón de prolina



TABLAS ADICIONALES:

Tabla A. Cambio de pH en el medio PVK tras 7 días de incubación

	pH inicial	pH final
P. citrinum	6,80	2,20
A. terreus	6,80	2,32
A. fumigatus	6,80	2,45
Rhodotorula spp.	6,80	2,29

Tabla B. Factores de conversión para resultados obtenidos con Spectroquant Test de fosfatos (114842) de "*Programming Data for Spectroquant® Test Kits: Calibration Information: wavelength, slope and blank value*"

Parameter	Order No.	Test Type	Measuring range lower limit	Measuring range upper limit	Unit	Chemical Form	Cell size used [mm]	Factor	Wave-length [nm]	Blank
Phosphate (VM)	1.14842	RT	1.0	30.0	mg/l	PO_4-P	10	18.0	410	OB
			0.5	15.0	mg/l	PO_4-P	20	9.00		
			3.1	92.0	mg/l	PO_4^{3-}	10	55.2		
			1.5	46.0	mg/l	PO_4^{3-}	20	27.6		
			2.3	68.7	mg/l	P_2O_5	10	41.3		
			1.1	34.4	mg/l	P_2O_5	20	20.6		

Tabla C. Resumen del tratamiento estadístico univariante

- **No paramétrico:** K-W: Kruskall Wallis y Wilcoxon como Post-hoc
- **Paramétrico:** A-T: ANOVA y Tukey como Post-hoc

Tratamiento NaCl (mM)	**0**	**100**	**200**
%Germinación	K-W	K-W	K-W
Longitud	A-T	K-W	K-W
Índice de Vigor	A-T	K-W	K-W
FV/FM	A-T	A-T	A-T
Plabs	A-T	A-T	A-T
Clorofilas totales	K-W	K-W	K-W
Carotenoides	A-T	K-W	K-W
Prolina	K-W	K-W	K-W
Conductancia	A-T	A-T	K-W

CHR	A-T	K-W	A-T
%Agua tubérculo	A-T	K-W	A-T
%Agua hojas	A-T	A-T	A-T
Longitud total	KW	KW	AT
Diámetro tubérculo	KW	KW	AT
Biomasa(g)	AT	KW	AT
No. de Hojas	KW	KW	KW
Área foliar	AT	KW	KW

BOXPLOTS

Donde:

AT: A. terreus

AF: A. fumigatus

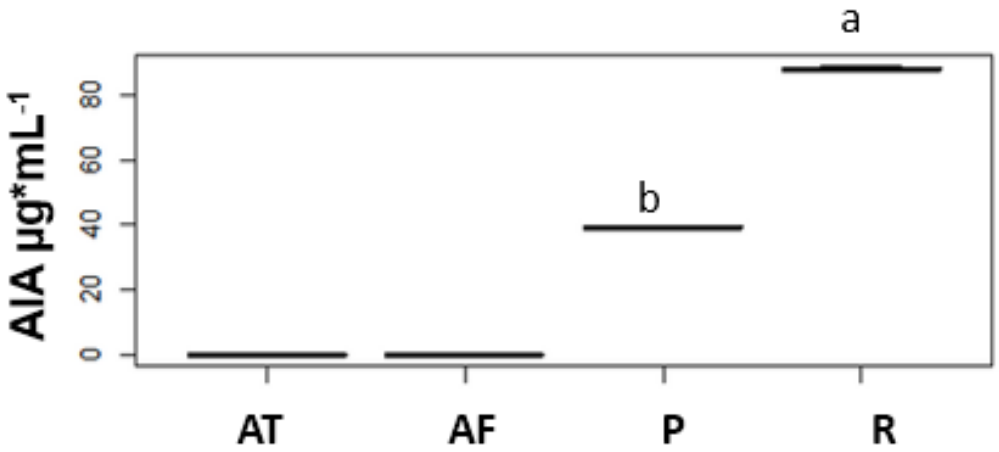
P: P. citrinum

R: Rhodotorula spp

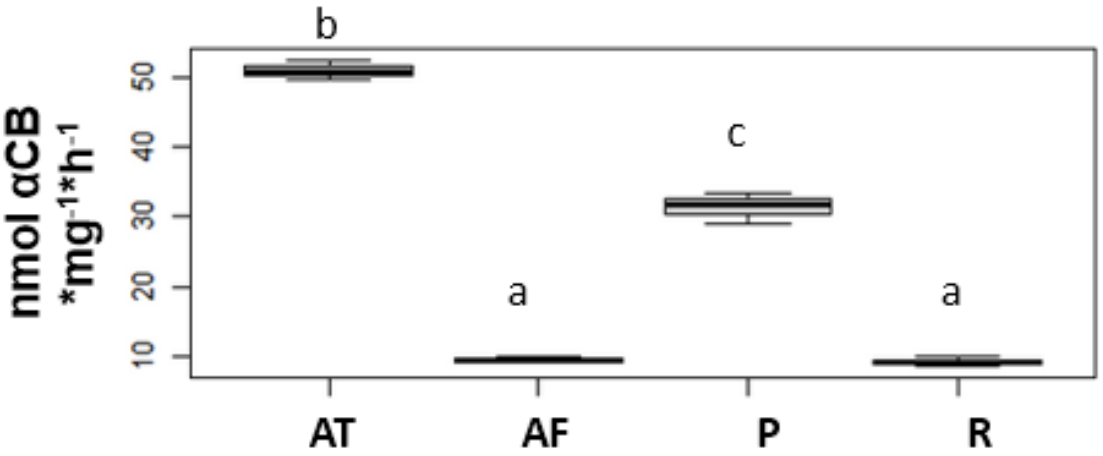
D: agua destilada, plantas no inoculadas

C: conjunto de hongos

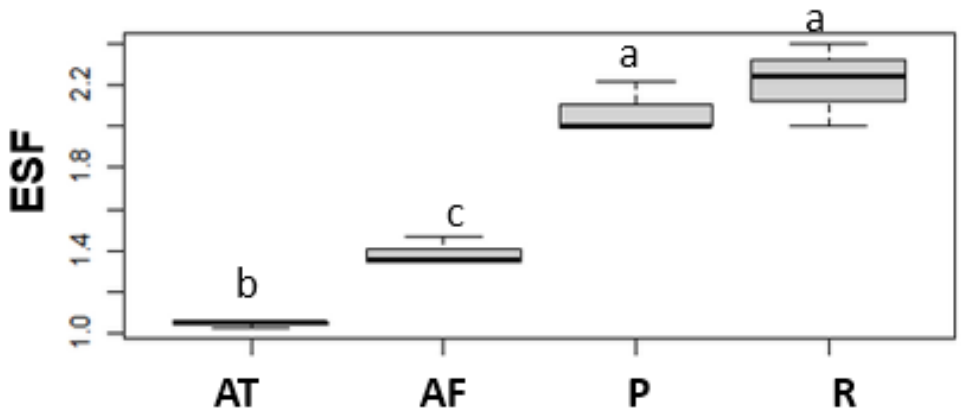
1. Boxplot de producción de AIA



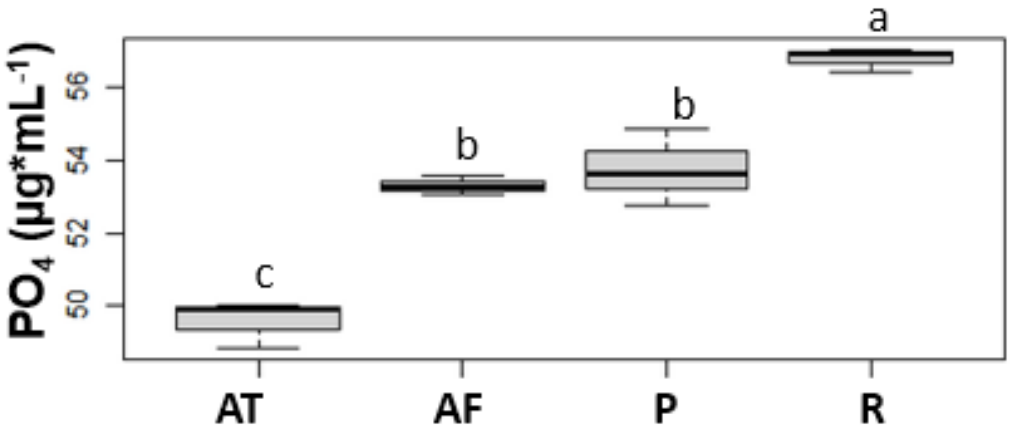
2. Boxplot Actividad ACC desaminasa



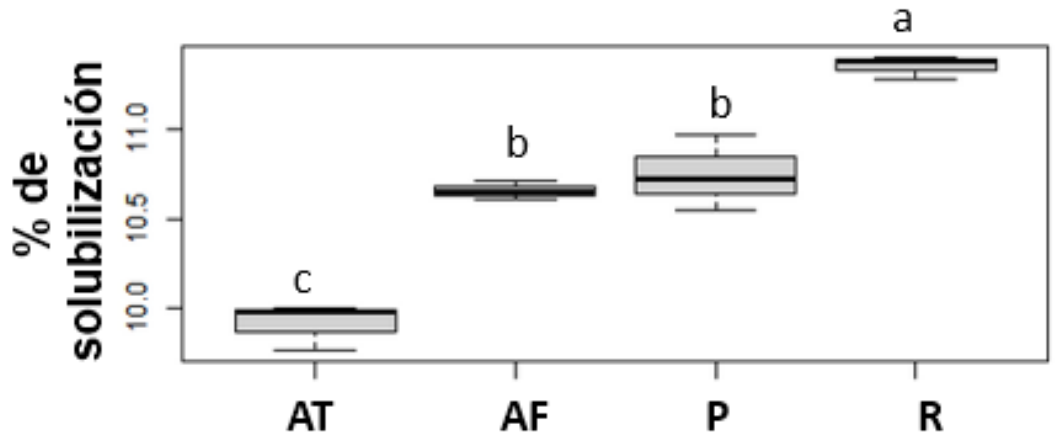
3. Boxplot Eficiencia Solubilizadora de Fosfatos (ESF)



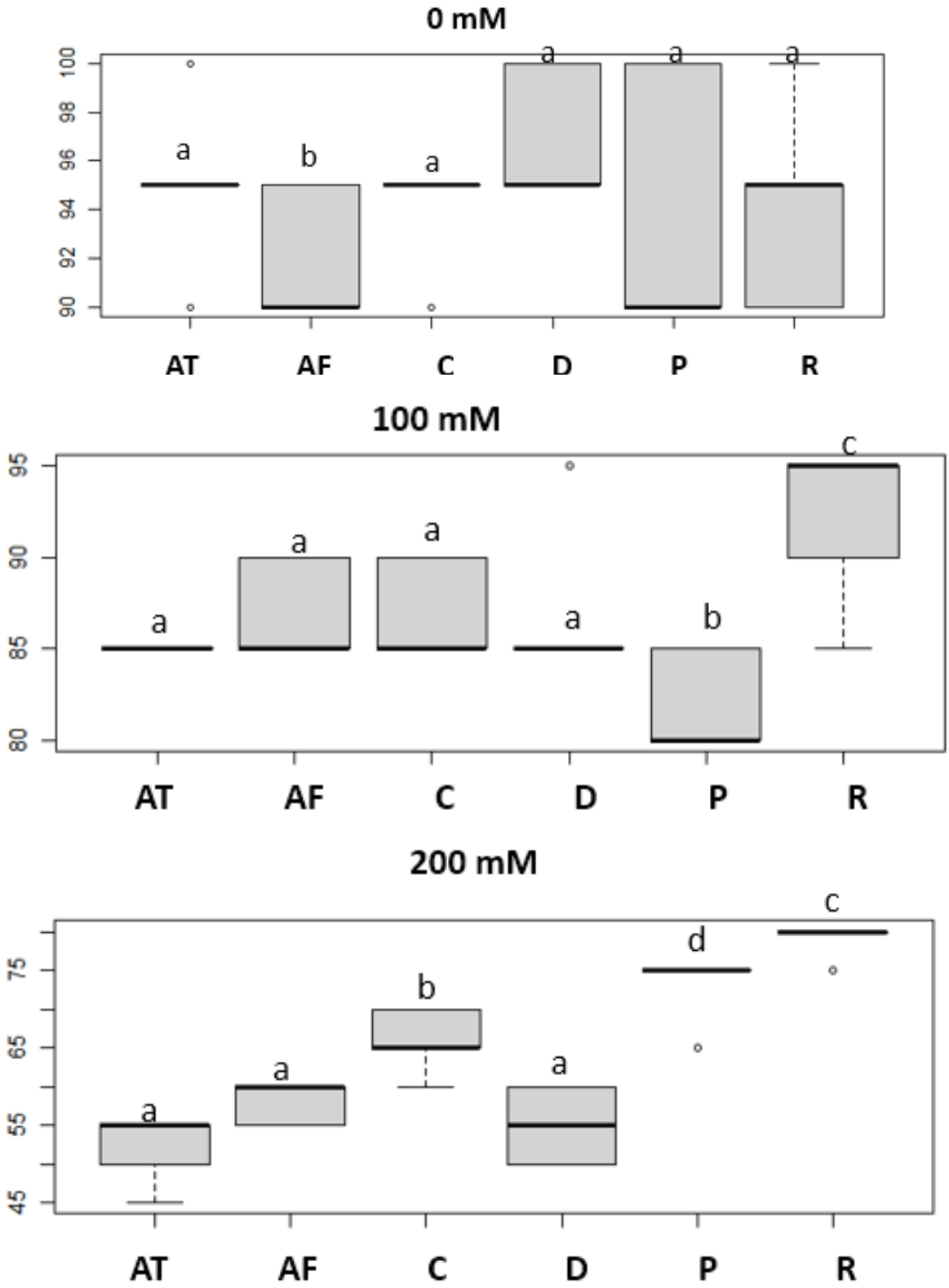
4. PO_4 Solubilizado



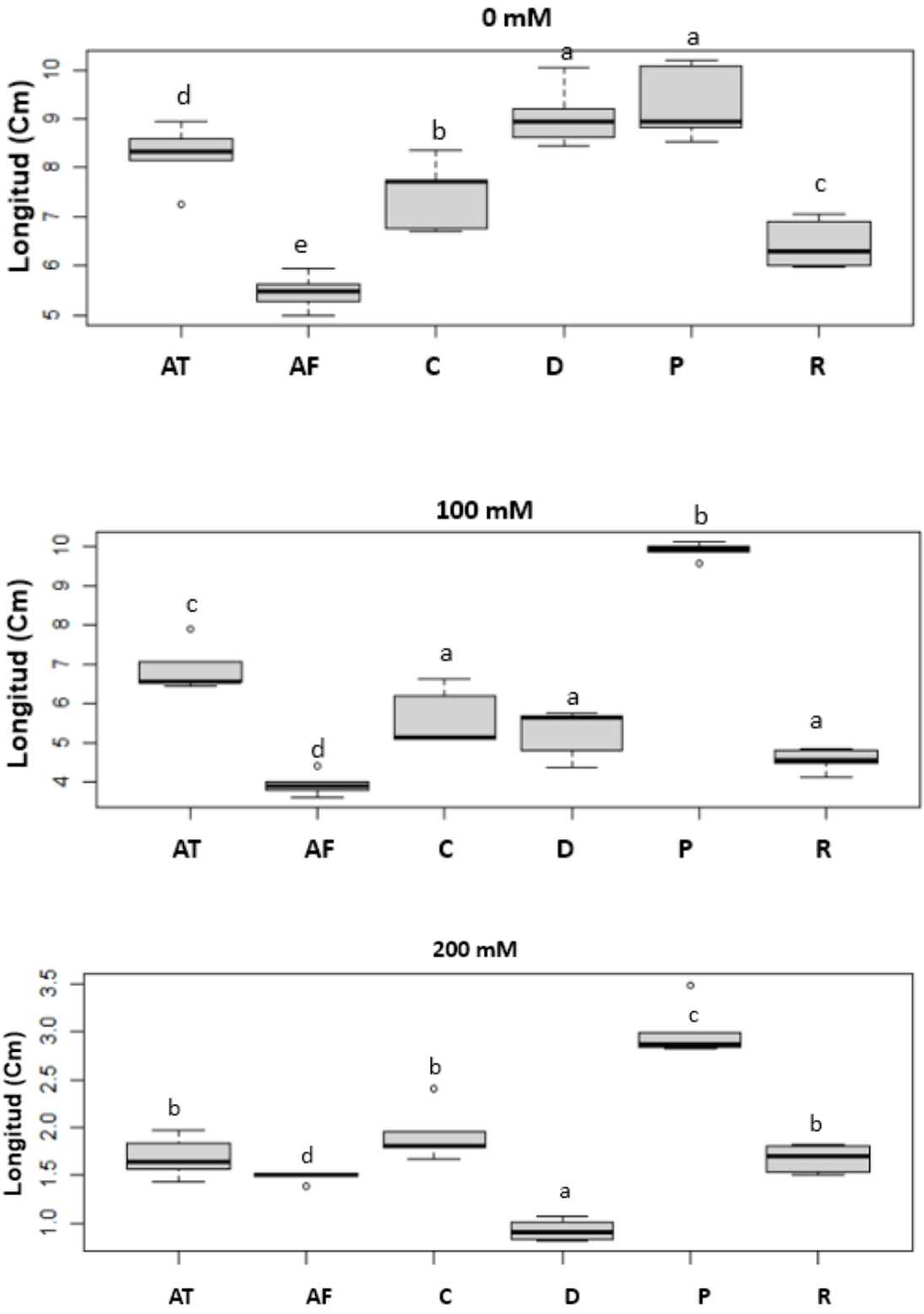
5. Porcentaje de solubilización



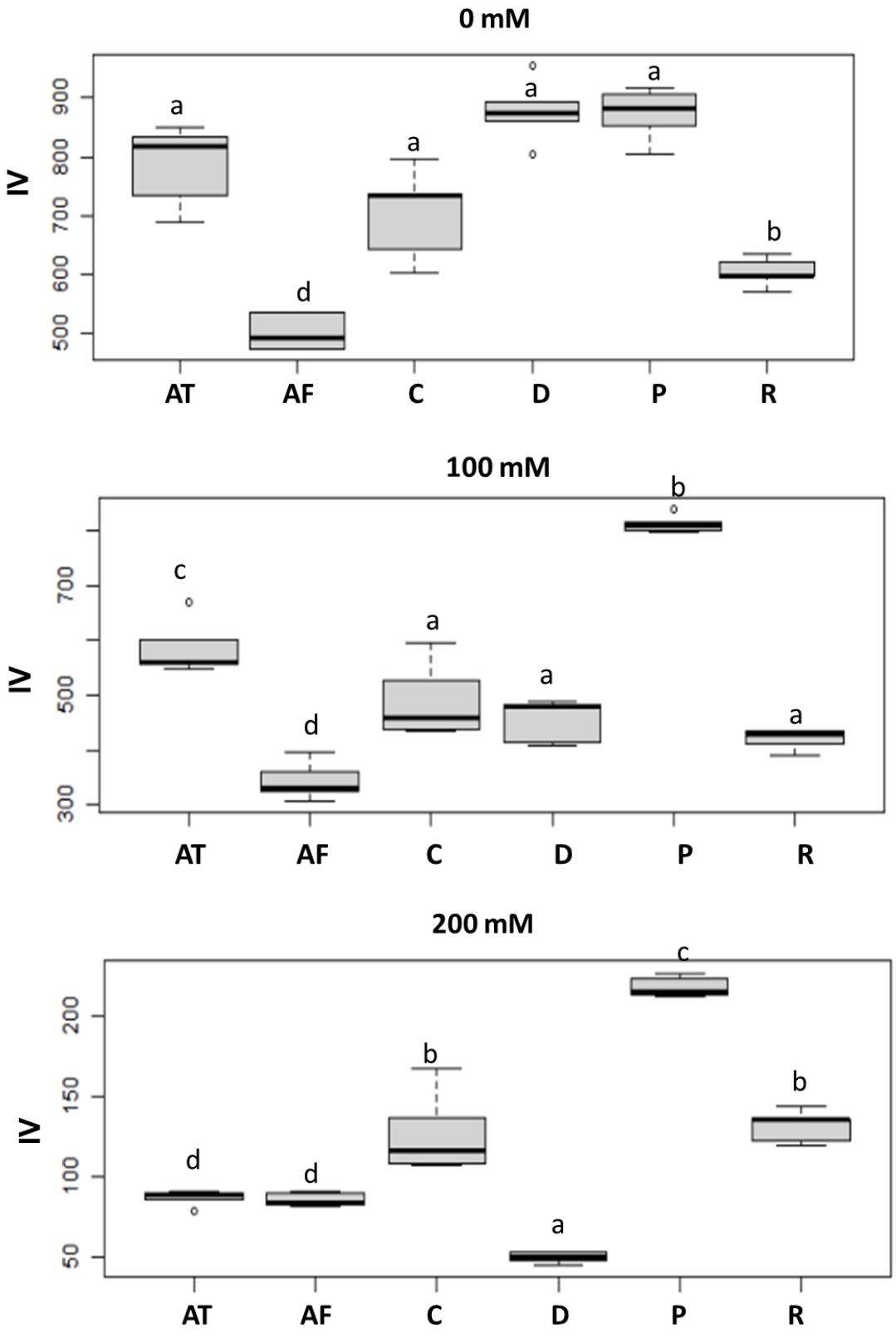
6. Boxplot % de germinación, en condiciones 0, 100 y 200 mM.



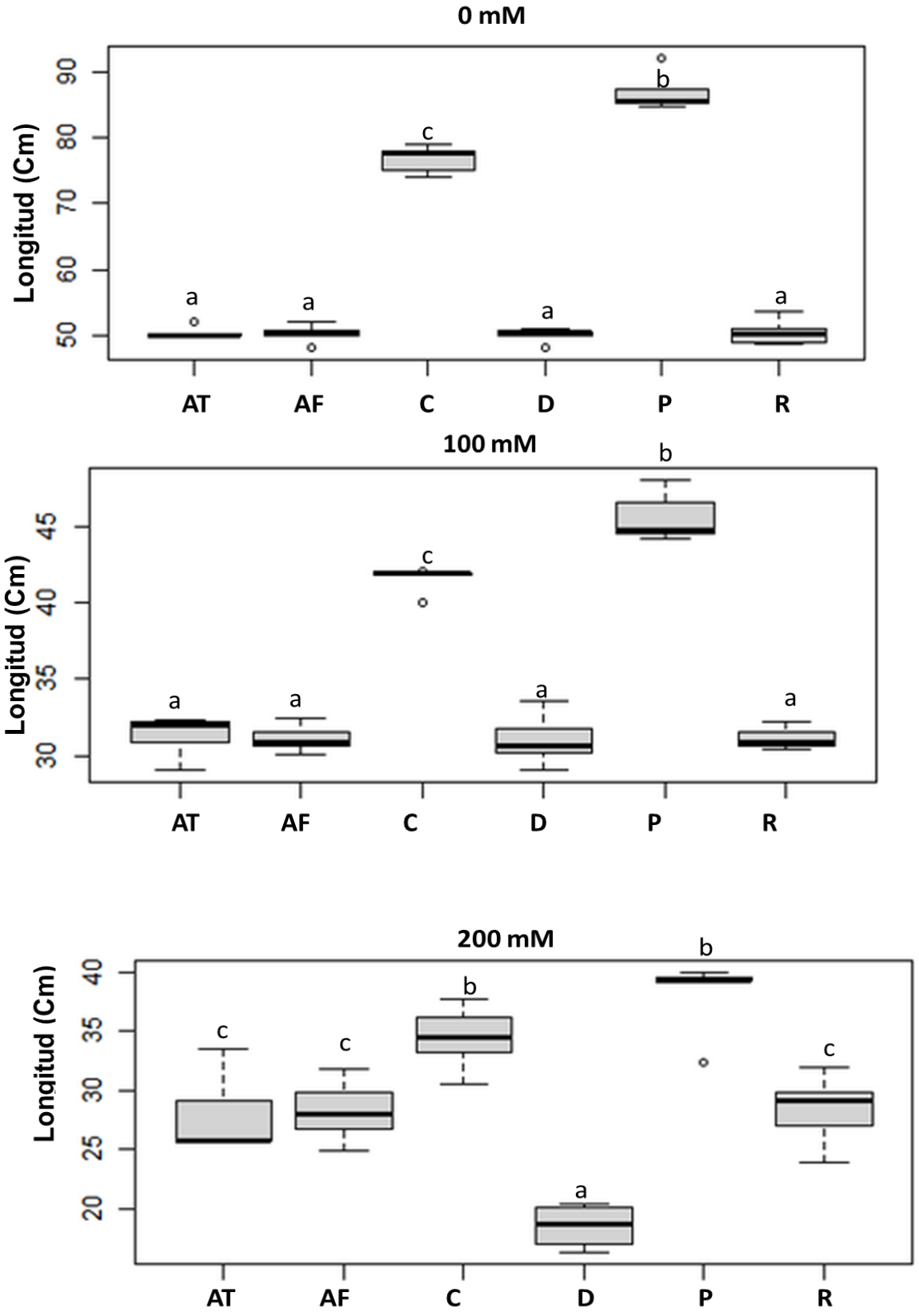
7. Boxplot % de longitud de las plántulas, en condiciones 0, 100 y 200 mM (Ensayo de germinación *in vitro*)



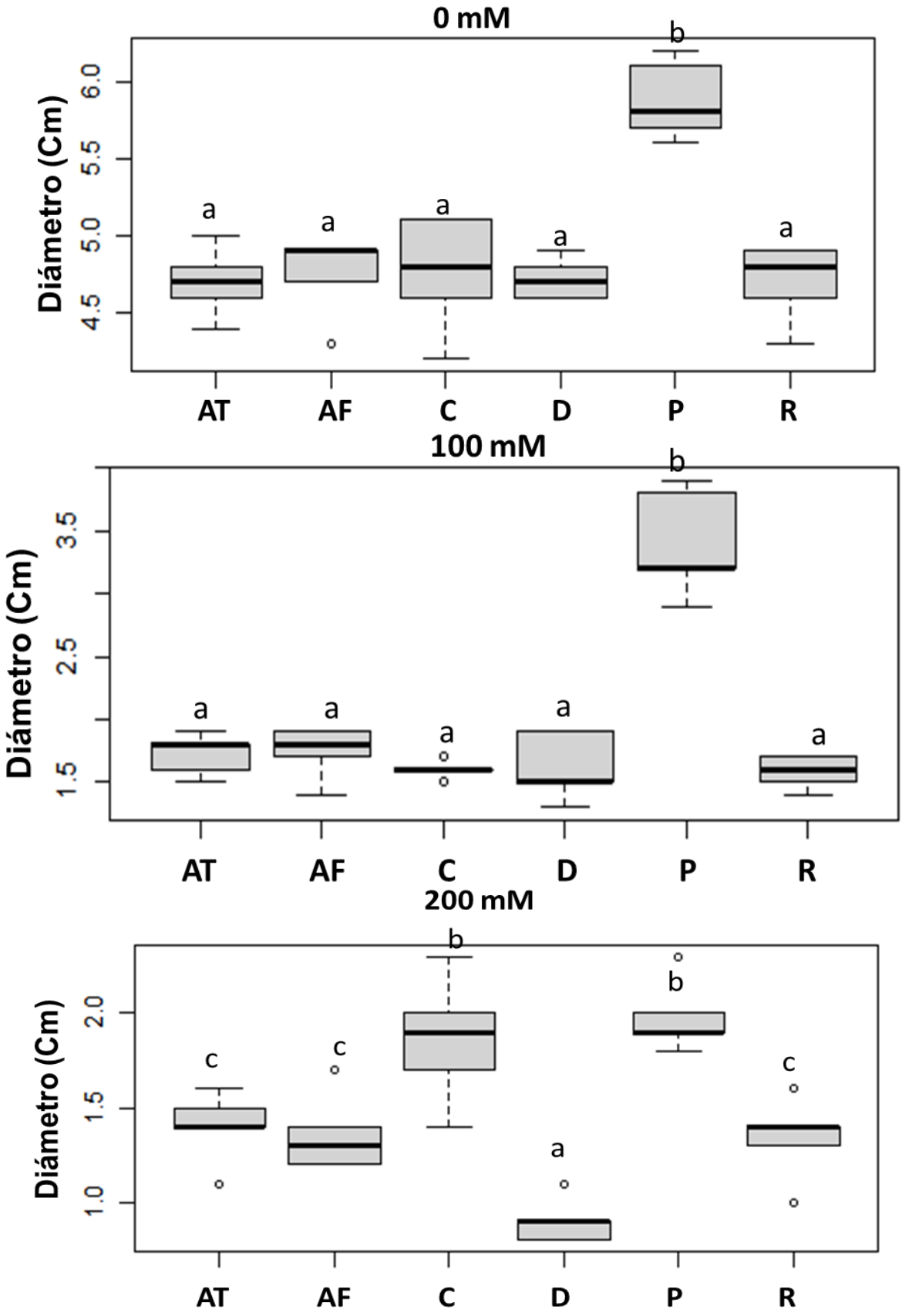
8. Boxplot % de índice de vígor, en condiciones 0, 100 y 200 mM (Ensayo de germinación in vitro)



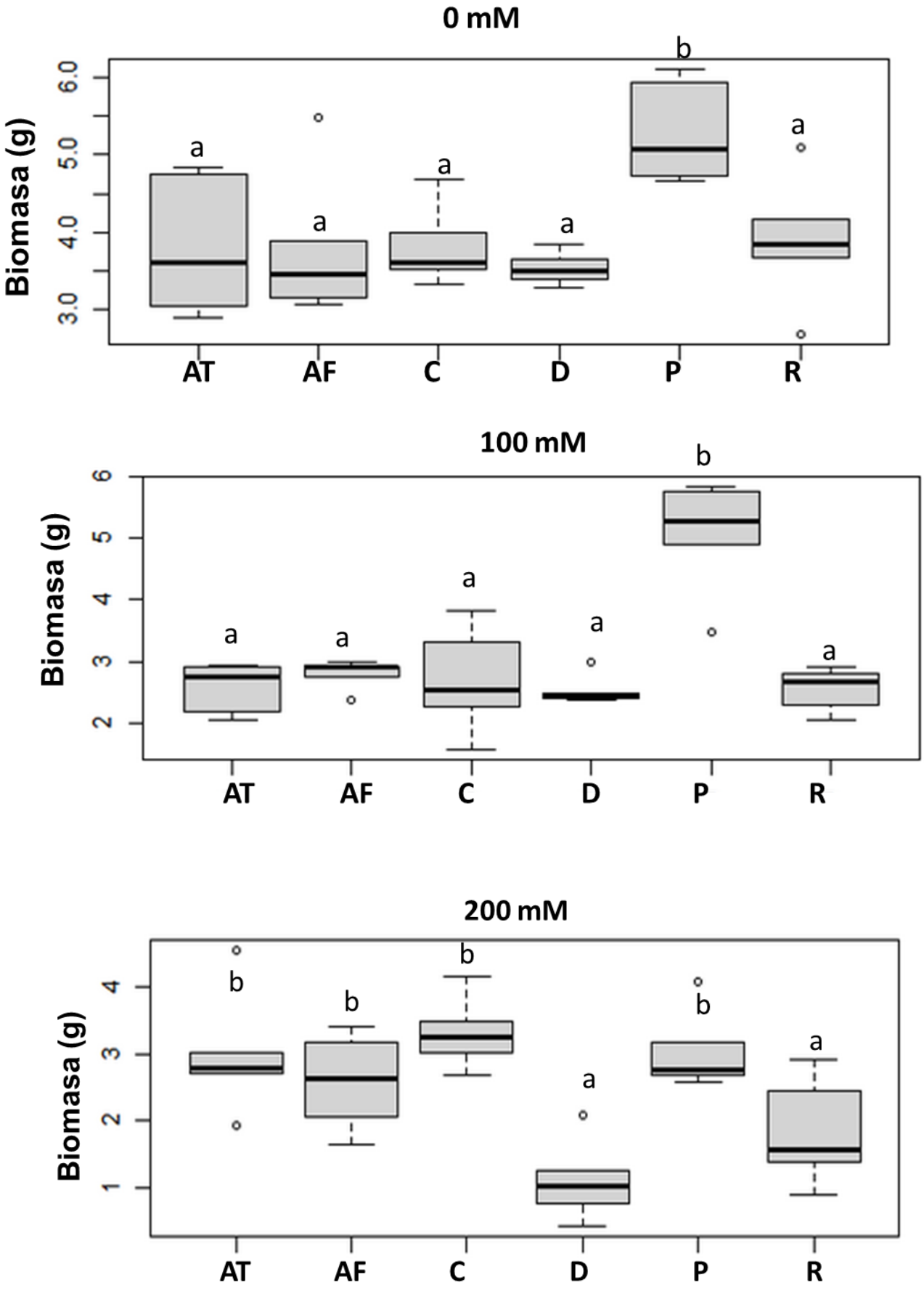
9. Boxplot longitud total de las plantas de rábano (Ensayo en condiciones de invernadero)



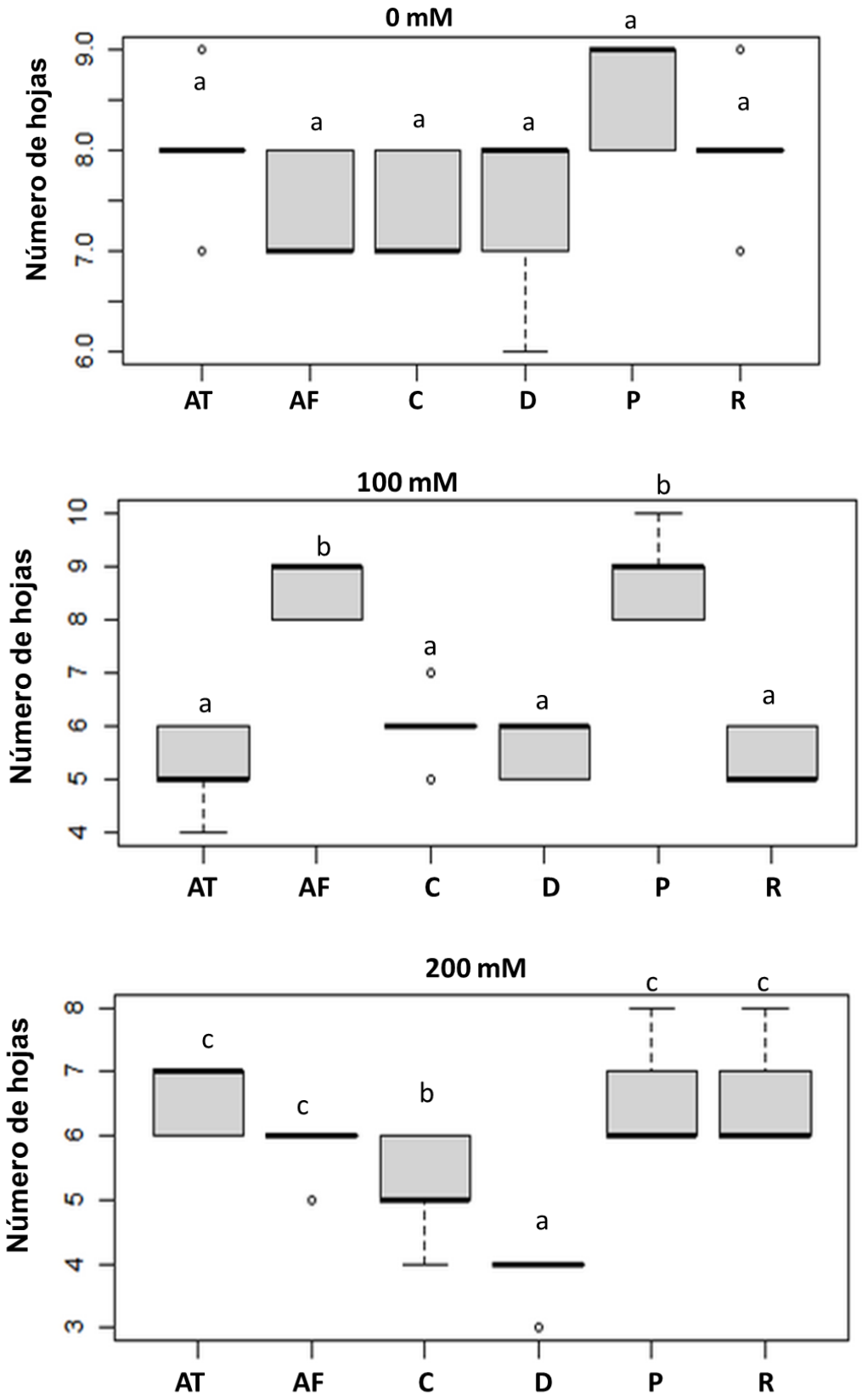
10. Boxplot diámetro del tubérculo



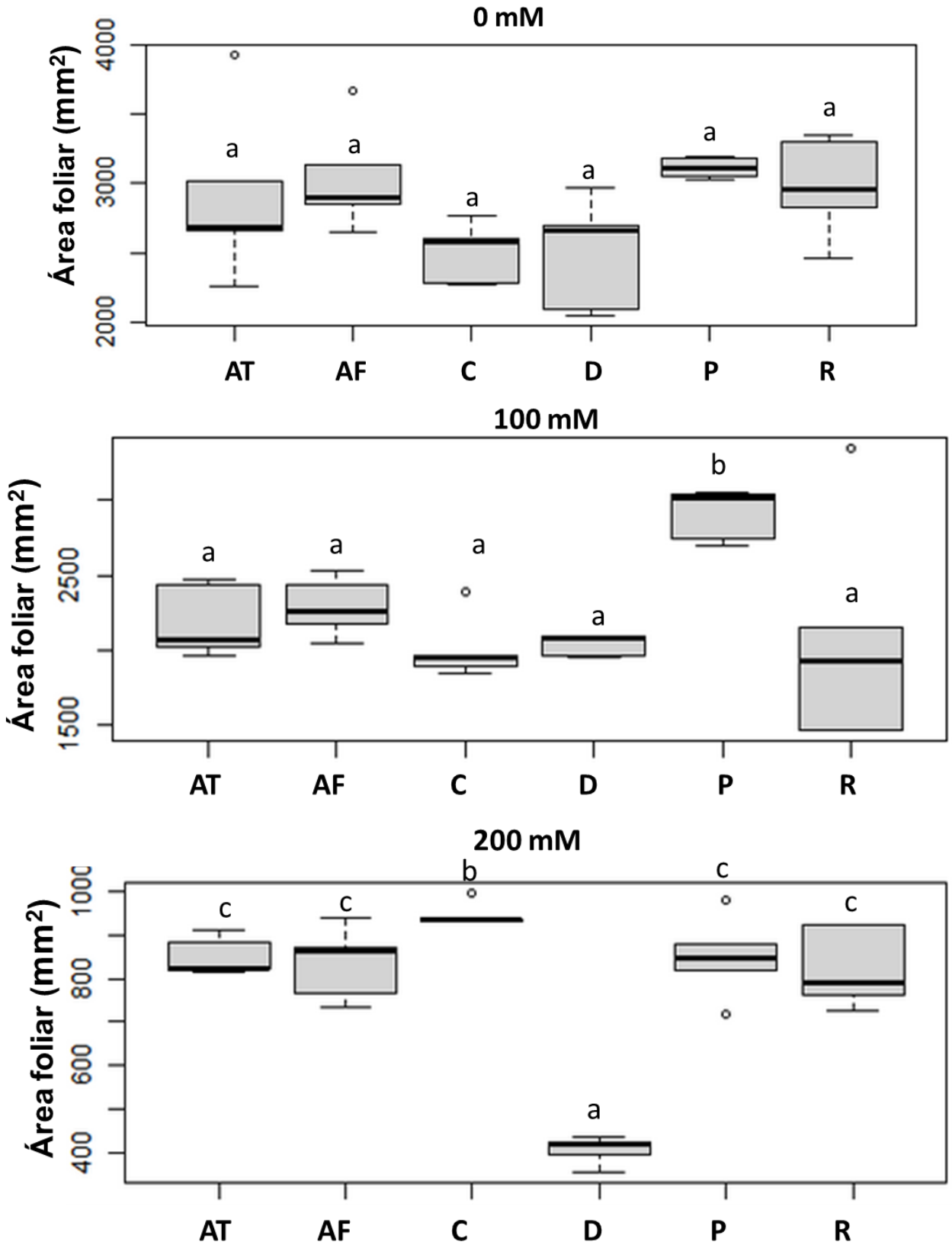
11. Boxplot biomasa seca



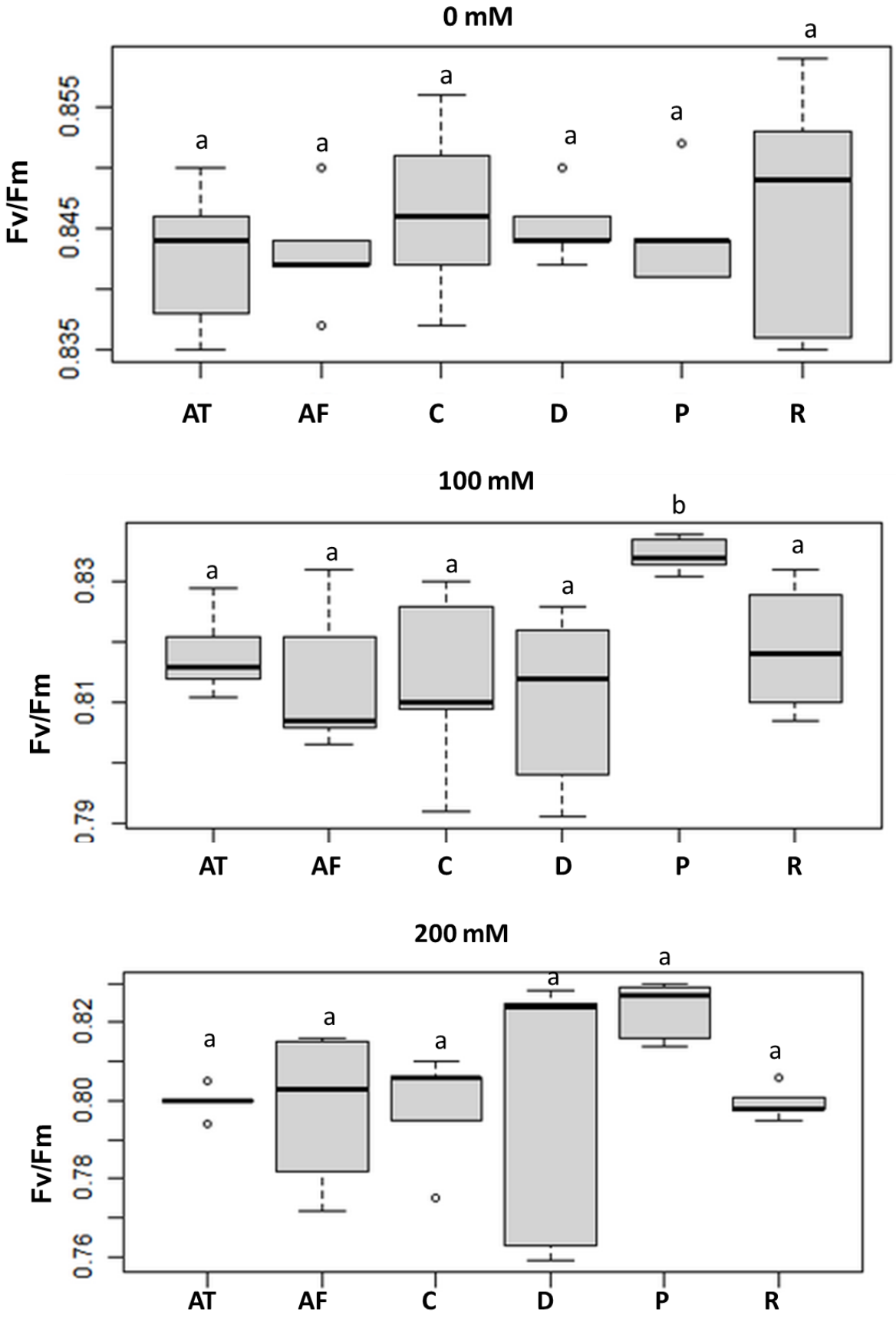
12. Boxplot número de hojas



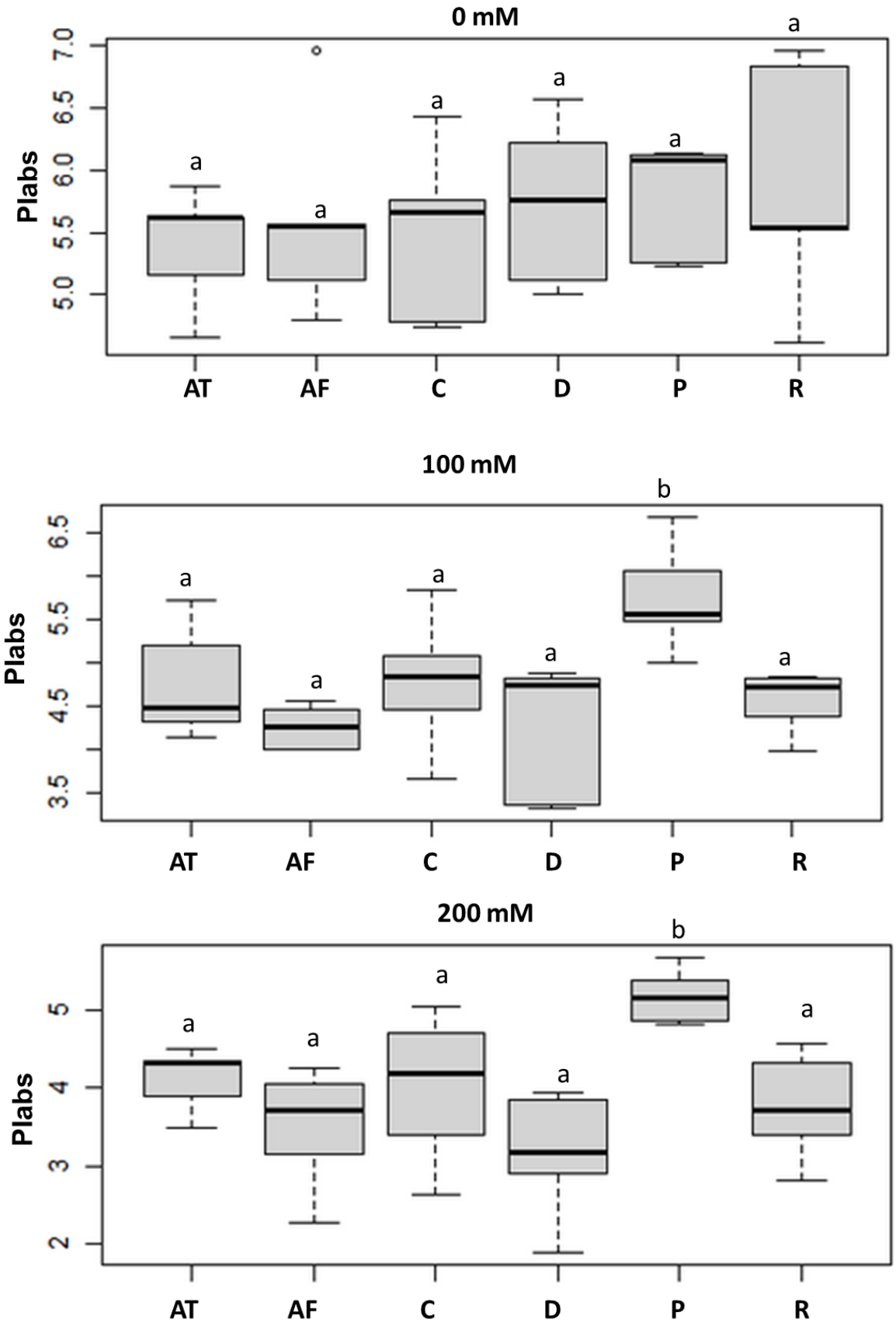
13. Boxplot área foliar



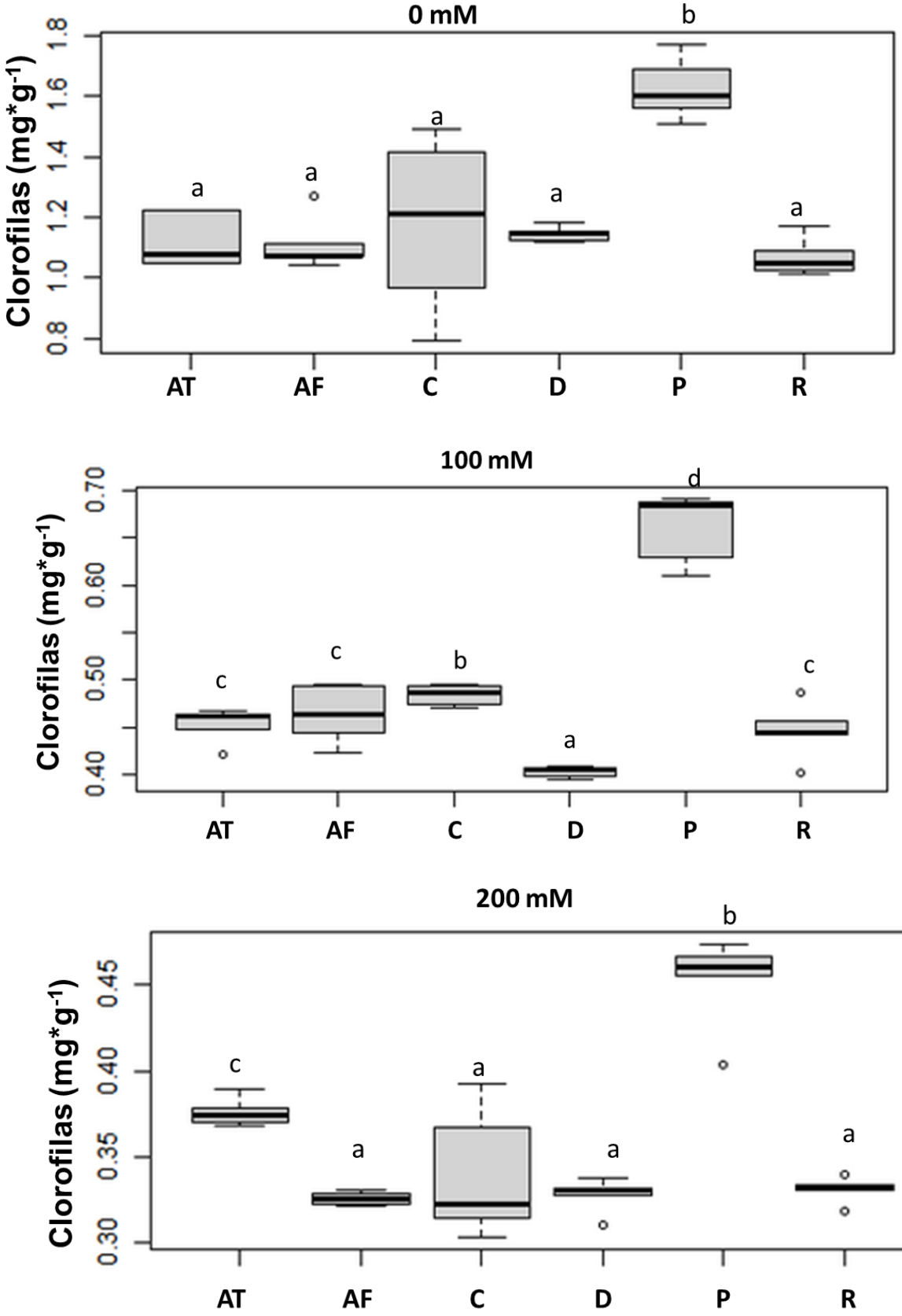
14. Boxplot Fv/fM



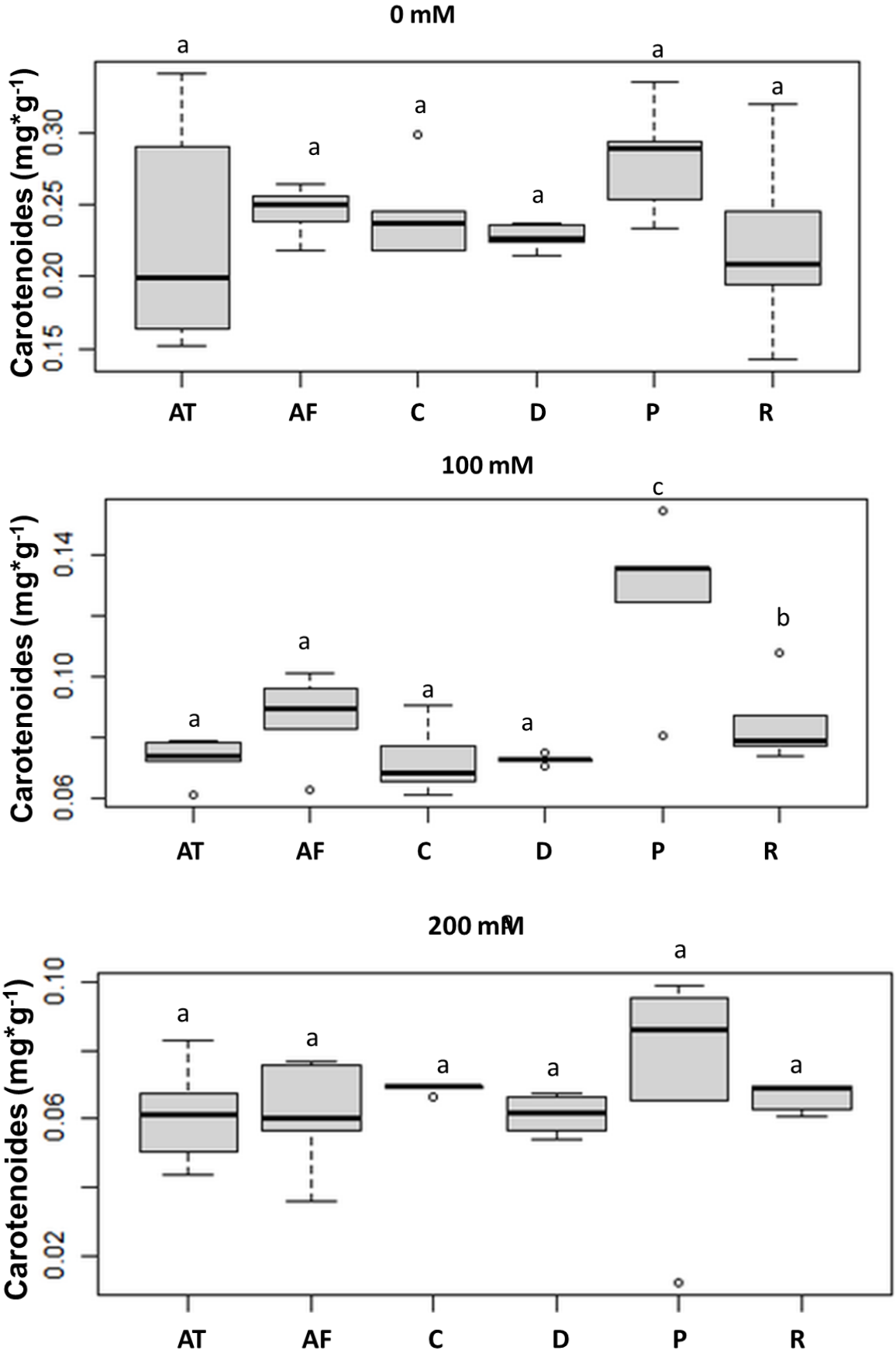
15. Boxplot Plabs (Índice de vitalidad de la muestra)



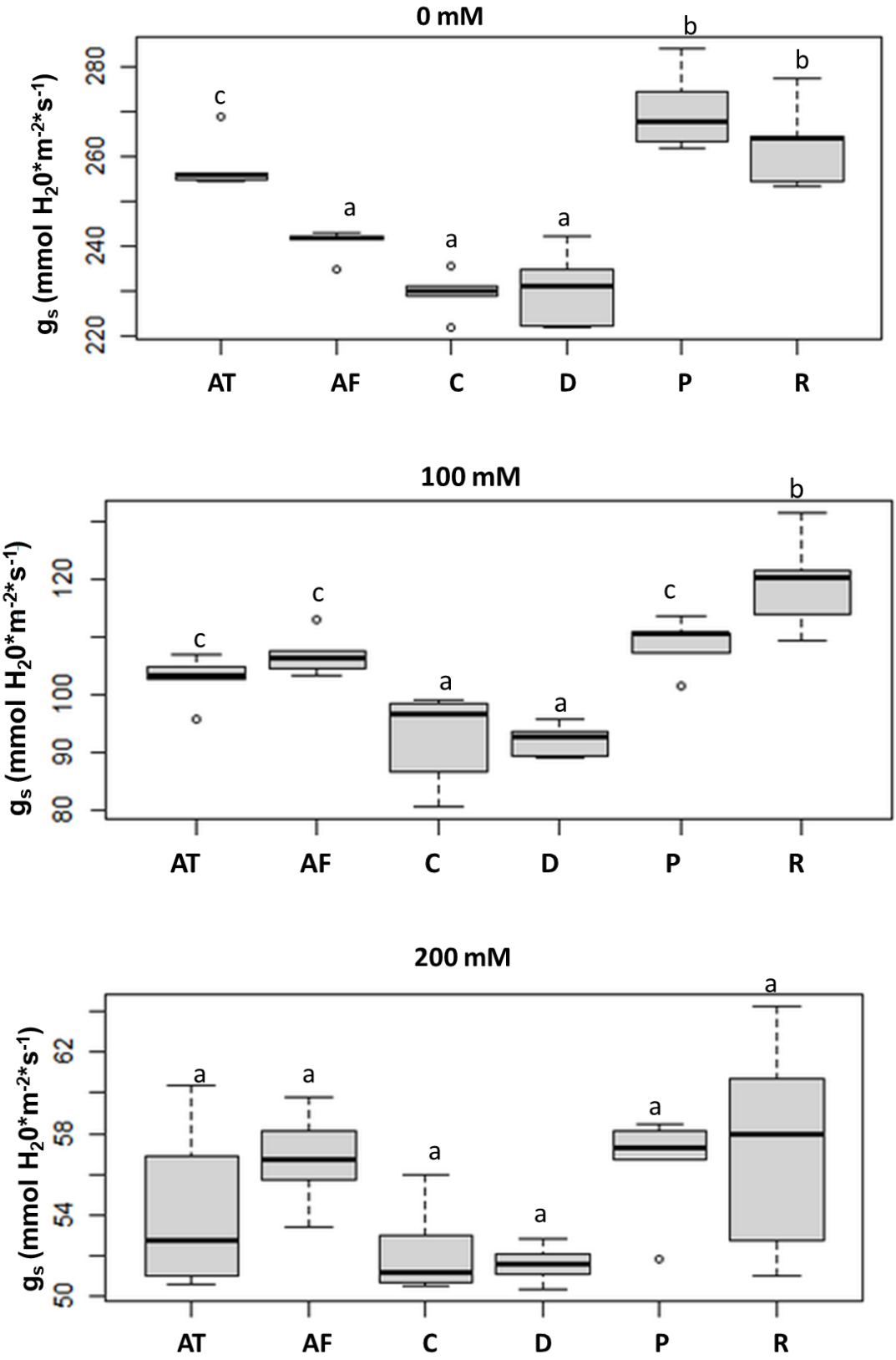
16. Boxplot contenido de clorofilas totales



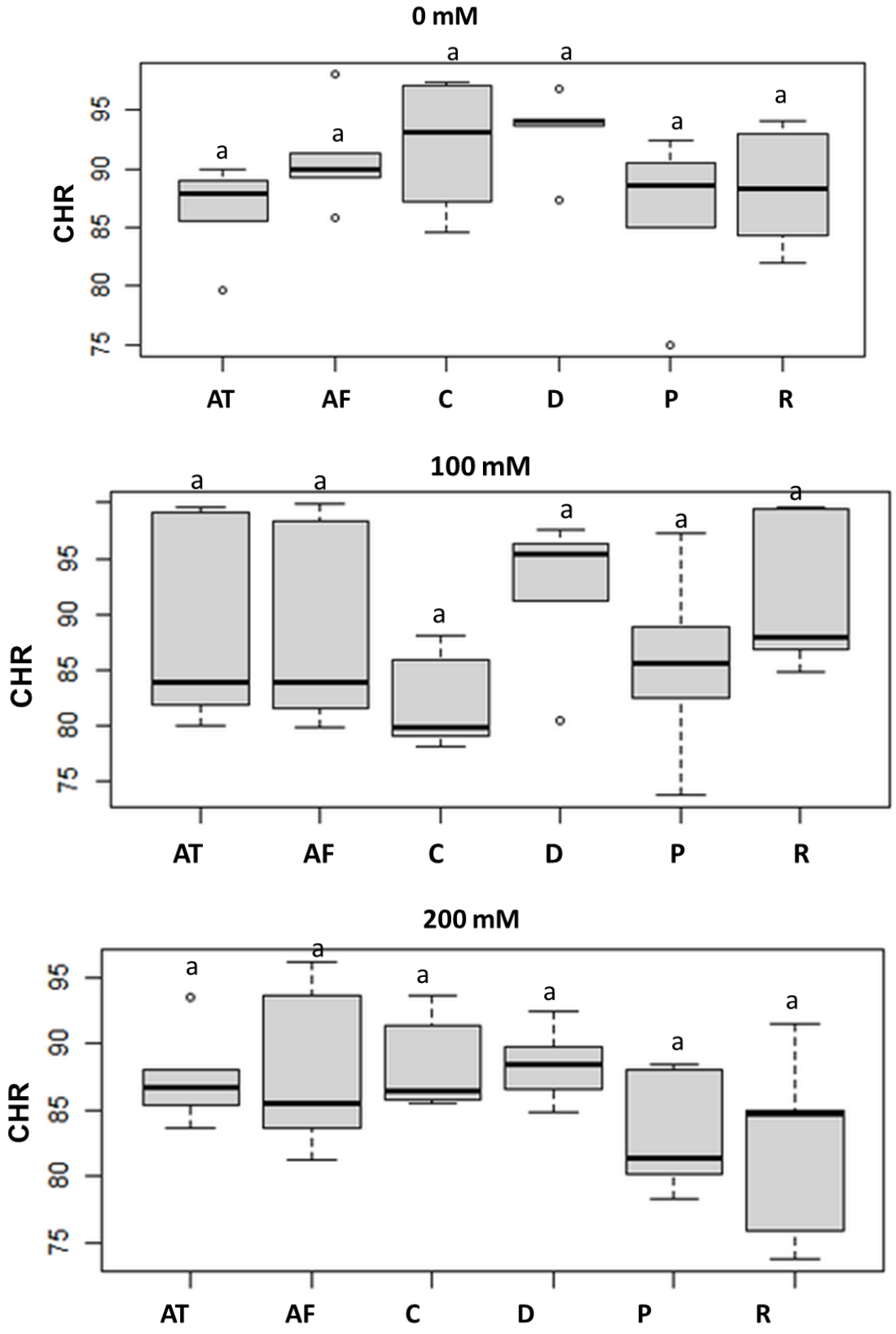
17. Boxplot contenido de carotenoides



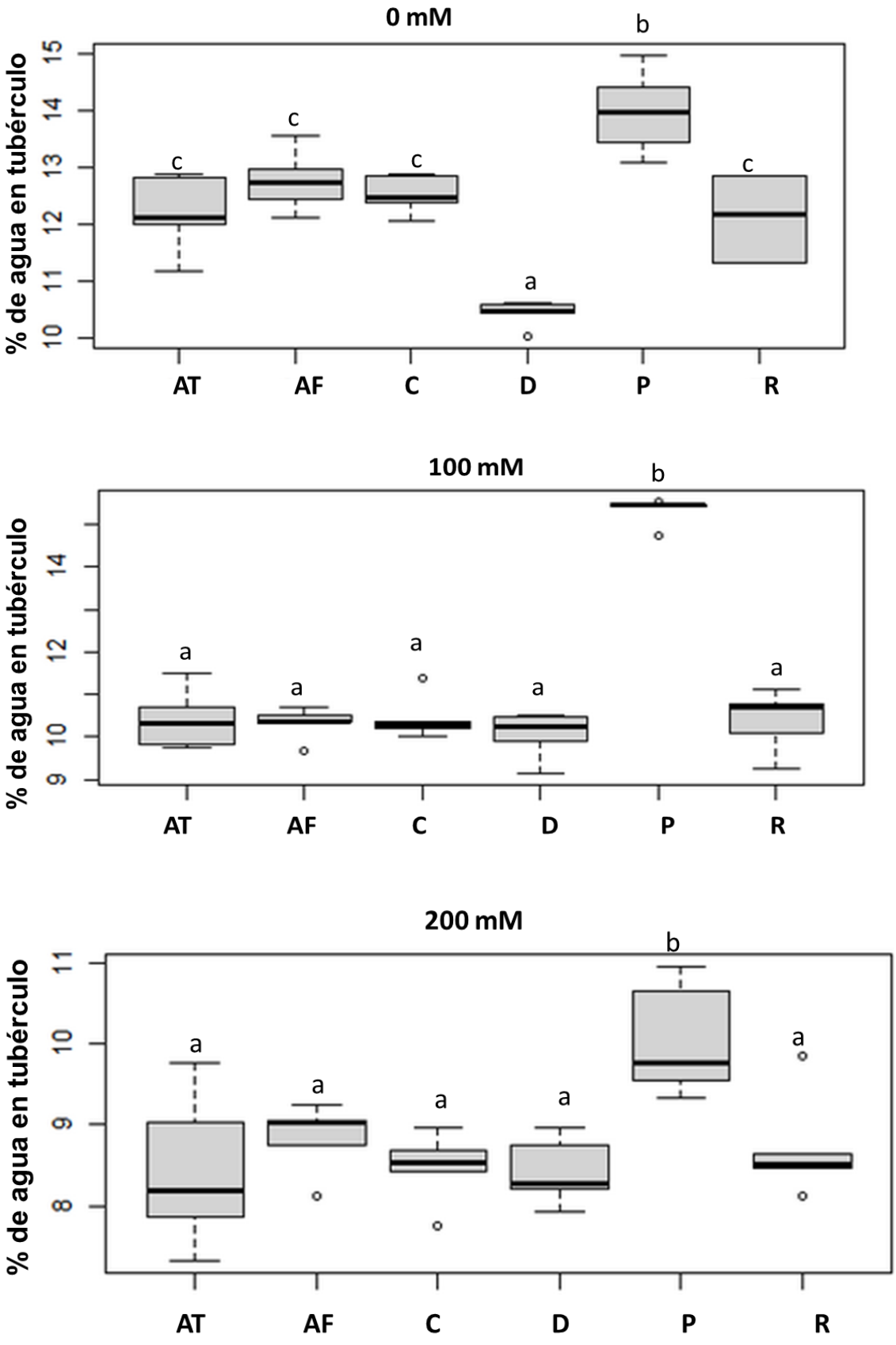
18. Boxplot conductancia estomática



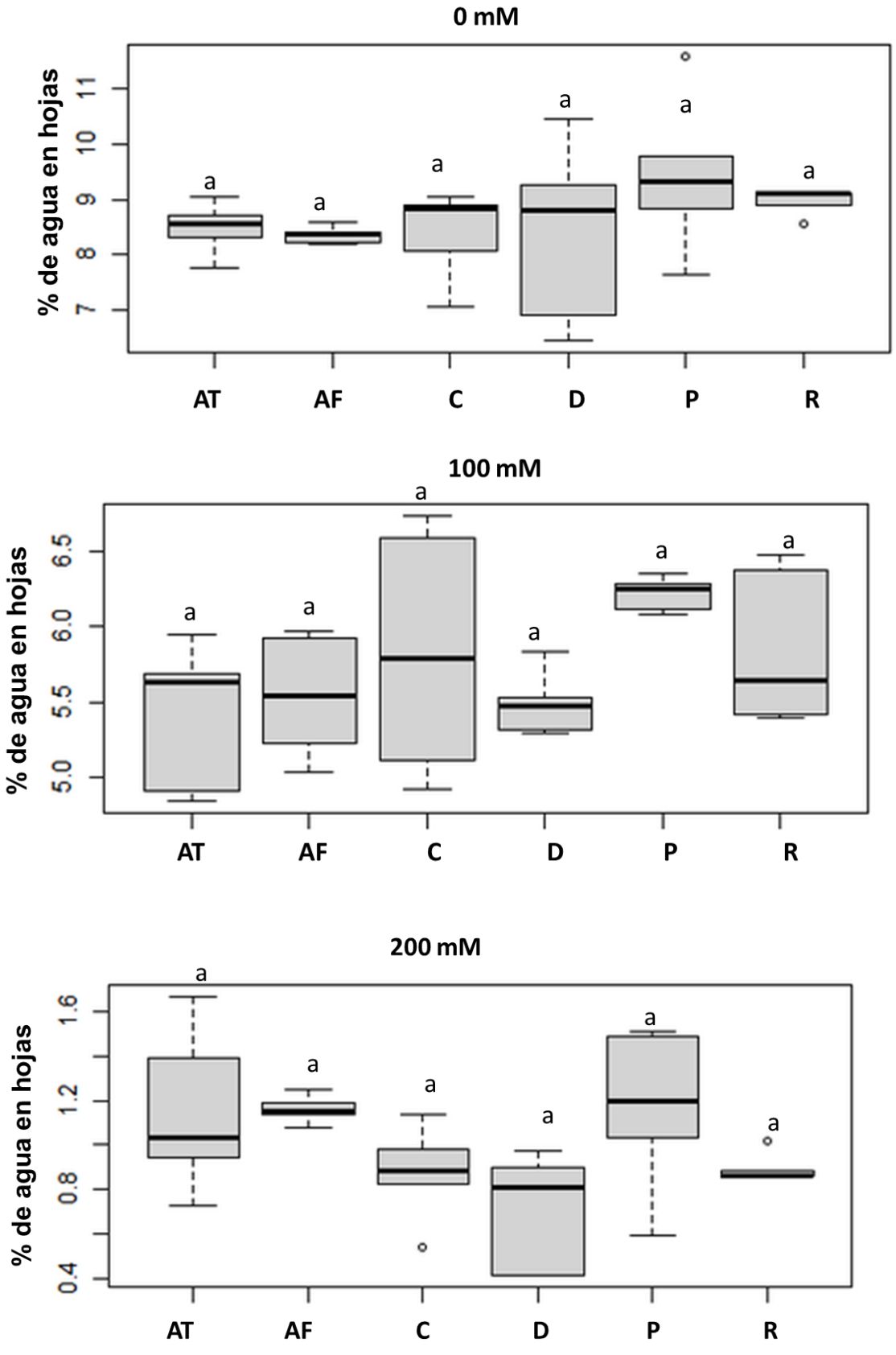
19. Boxplot Contenido Hídrico Relativo (CHR)



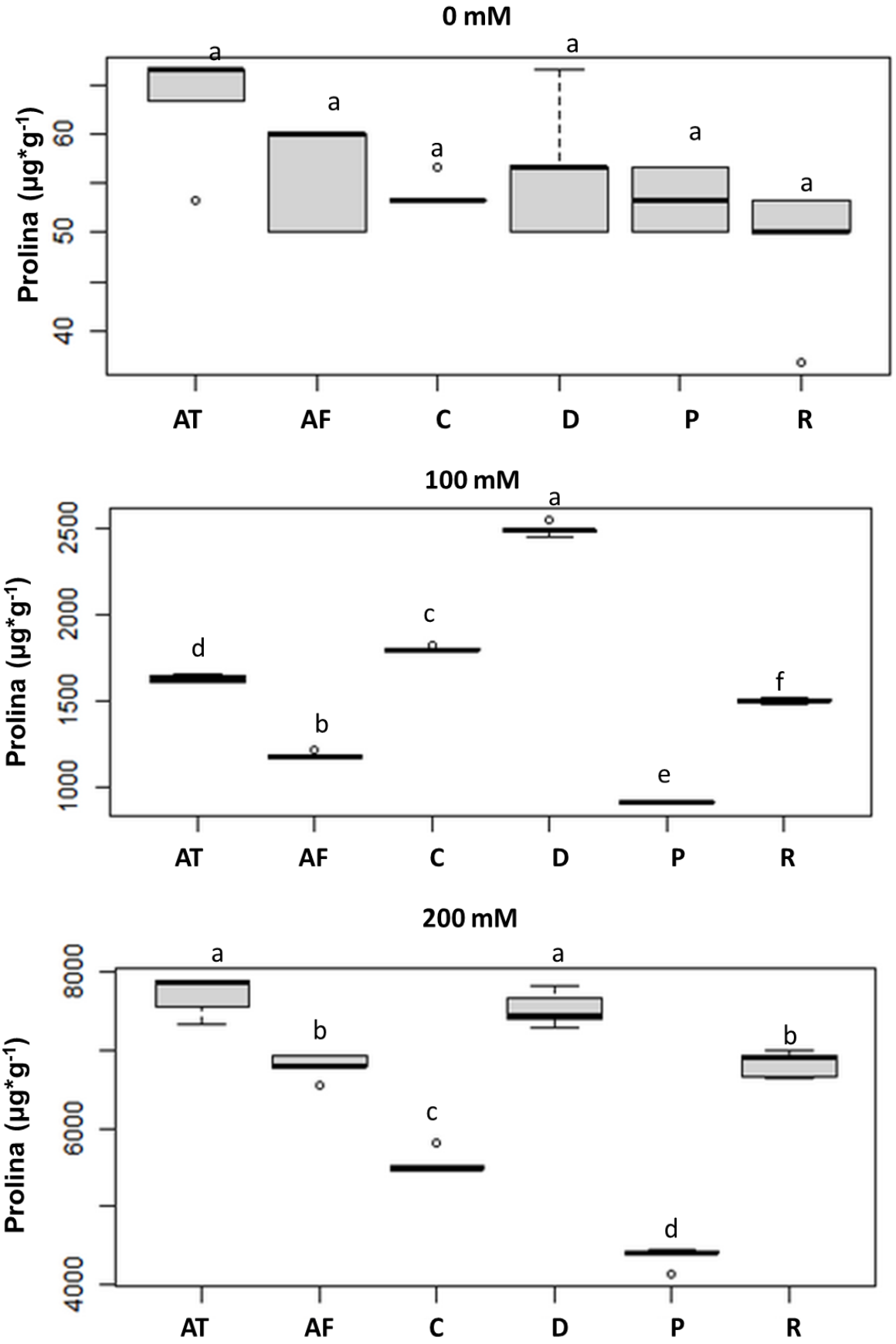
20. Boxplot Contenido de agua en tubérculo



21. Boxplot Contenido de agua en hojas



22. Boxplot contenido de prolina



COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO:

1. **Caldo Czapek (Pazouki et al., 2005):**

g/L

Sacarosa 30

Nitrato de sodio 2

Fosfato dipotásico 1

Sulfato de Magnesio 0,5

Cloruro de potasio 0,5

Sulfato ferroso 0,01

pH 7,3

2. **Agar Pikovskaya para solubilización de P (Pikovskaya 1948, modificado por Cisneros, 2015):**

g/L

Glucosa 10

Sulfato de amonio 0,5

Cloruro de potasio 0,2

Sulfato de magnesio hexahidratado 0,1

Sulfato de manganeso heptahidratado 0,002

Sulfato de hierro heptahidratado 0,002

Cloruro de sodio 0,2

Agar 20

Fuente de fosfato inorgánico (Fosfato tricálcico) 0,5

pH 7,0

3. **Agar CMC (Tanaka et al., 1980):**

g/L

Carboximetilcelulosa 5

Sulfato de manganeso 0,2

Sulfato de magnesio 2

Fosfato monobásico de potasio 2

Agar

pH 7,0

4. **Medio líquido sintético para Actividad ACCD (Yedidia et al., 1999)**

g/L

Glucosa 15

Sulfato de magnesio heptahidratado 0,2

Fosfato dipotásico 0,6

Cloruro de potasio 0,15

Sulfato de hierro 0,002

Sulfato de manganeso 0,002

Sulfato de Zinc 0,002

Cloruro de cobalto 0,002

Ácido amino-ciclopropano-carboxílico 0,303

pH 7,0

5. **Medio para halófilos M63 (Otzkur et al., 2015)**

Fosfato de potasio monobásico 13,6

Sulfato de amonio 2,0

Sulfato de hierro heptahidratado 0,5

Glucosa 0,5%

pH 7,0

14.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel A., Mohammad A. Abbas, Amal A. Abdel Wahid, W. Paul Quick, Gaber M. Abogadallah, (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of Pancratium maritimum L. to salt-stress, Journal of Experimental Botany, Volume 54, Issue 392. Pages 2553–2562, https://doi.org/10.1093/jxb/erg277
- Abdel T.M.; Alawlaqi, M.M. (2018) Molecular Identification of Rhizospheric Thermo-Halotolerant Aspergillus terreus and Its Correlation to Sustainable Agriculture. BioResources Doi: 1380128023.
- Africano K, Pinzón E. (2014). Comportamiento fisiológico de plantas de rábano (Raphanus sativus L.) sometidas a estrés por salinidad. Conexión agropecuaria JDC 4(2), p 13-24.
- Ahima, J., Zhang, X., Yang, Q., Zhao, L., Maurice Tibiru, A., Zhang, H. (2019). Biocontrol activity of Rhodotorula mucilaginosa combined with salicylic acid against Penicillium digitatum infection in oranges. Biological Control. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.0
- Ali, I., Khaliq, S., Sajid, S., Akbar, A. (2019). Biotechnological Applications of Halophilic Fungi: Past, Present, and Future. Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance, 291–306. doi:10.1007/978-3-030-19030-9_1
- Ali, R., Gul, H., Hamayun, M., Rauf, M., Iqbal, A., Shah, M., Hussain, A., Bibi, H., Lee, I.-J. (2021). Aspergillus awamori ameliorates the physicochemical characteristics and mineral profile of mung bean under salt stress. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 8(1). https://doi.org/10.1186/s40538-021-00208-9
- Asaf, S.; Hamayun, M.; Khan, A.L.; Waqas, M.; Khan, M.A.; Jan, R.; Lee, I.J.; Hussain, A (2018). Salt tolerance of Glycine max. L induced by endophytic fungus Aspergillus flavus CSH1, via regulating its endogenous hormones and antioxidative system. Plant Physiol. Biochem, 128, 13–23.
- Ashraf, M., Shahzad, S. M., Imtiaz, M., Rizwan, M. S. (2018). Salinity effects on nitrogen metabolism in plants-focusing on the activities of nitrogen

metabolizing enzymes: A review. J. Plant Nutr. 41, 1065–1081. doi: 10.1016/ j. crvi.2009.03.009

- Asif M, Anwar H, Muhammad I, Naeem K, Muhammad H, Ismail Sahib Gul Afridi, In-Jung Lee (2018) IAA and flavonoids modulates the association between maize roots and phytostimulant endophytic Aspergillus fumigatus greenish, Journal of Plant Interactions, 13:1, 532-542, DOI: 10.1080/17429145.2018.1542041
- Ayyub CM, Shaheen MR, Raza S, Yaqoob MS, Qadri RWK, Azam M, Ghani MA, Khan I, Akhtar N (2016). Evaluation of different radish (Raphanus sativus) genotypes under different saline regimes. American Journal of Plant Sciences 7(6):894-898. DOI: http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2016.76084
- Badawy, A.A.; Alotaibi, M.O.; Abdelaziz, A.M.; Osman, M.S.; Khalil, A.M.A.; Saleh, A.M.; Mohammed, A.E.; Hashem, A.H (2021) Enhancement of Seawater Stress Tolerance in Barley by the Endophytic Fungus Aspergillus ochraceus. Metabolites , 11, 428. https://doi.org/10.3390/metabo11070428
- Bano, A., Hussain, J., Akbar, A., Mehmood, K., Anwar, M., Hasni, M. S., Ali, I. (2018). Biosorption of heavy metals by obligate halophilic fungi. Chemosphere, 199, 218–222. doi:10.1016/j.chemosphere.2018
- Beltagi, S., mohamed, A., Rashed, m. M. (2010). Response of Antioxidative Enzymes to Cadmium Stress in Leaves and Roots of Radish (Raphanus sativus L.). Notulae Scientia Biologicae, 2(4), 76-82. https://doi.org/10.15835/nsb245395
- Bernstein, N. (2019). Plants and salt: Plant response and adaptations to salinity. Model Ecosystems in Extreme Environments, 101–112. doi:10.1016/b978-0-12-812742-1.00005-2
- Bibi, S., Hussain, A., Hamayun, M., Rahman, H., Iqbal, A., Shah, M., … Islam, B. (2018). Bioremediation of hexavalent chromium by endophytic fungi; safe and improved production of Lactuca sativa L. Chemosphere, 211, 653–663. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.
- Bonilla M (2005). Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la Cordillera Oriental de Colombia. Colección Textos . Universidad Nacional de Colombia - Unibiblos, Bogotá. p 177-190.

- Boughalleb, N., Salem, I. B., M'Hamdi, M. (2018). Evaluation of the efficiency of Trichoderma, Penicillium, and Aspergillus species as biological control agents against four soil-borne fungi of melon and watermelon. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28(1). doi:10.1186/s41938-017-0010-3
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Tohge, T., Fernie, A. R., Chet, I., et al. (2013). Trichoderma-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. PLoS Pathog. 9:e1003221. doi: 10.1371/journal.ppat.1003221
- Callejas, R., Kania, E., Contreras, A., Peppi, C., Morales, L. (2013). Evaluación de un método no destructivo para estimar las concentraciones de clorofila en hojas de variedades de uva de mesa. Idesia, 31(4), 19–26. https://doi.org/10.4067/S0718-34292013000400003
- Calvente, V., de Orellano, M. E., Sansone, G., Benuzzi, D., Sanz de Tosetti, M. I. (2001). Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by Rhodotorula strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 26(4), 226–229. doi:10.1038/sj.jim.7000117
- Cao, W. H., Liu, J., He, X. J., Mu, R. L., Zhou, H. L., Chen, S. Y., et al. (2007). Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. Plant Physiol. 143, 707–719. doi: 10.1104/pp.106.094292
- Casares. E. (1981). Producción de hortalizas. Tercera edición. San José Costa Rica. Pág. 272-275
- Chammoun N, Geller D, Das K (2013). Fuel properties, performance testing and economic feasibility of Raphanus sativus (oilseed radish) biodiesel. Industrial Crops and Products, 45, 155–159. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.029
- Cheng, Z., Chi, M., Li, G., Chen, H., Sui, Y., Sun, H. Liu, J. (2016). Heat shock improves stress tolerance and biocontrol performance of Rhodotorula mucilaginosa. Biological Control, 95, 49–56. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.01.001
- Dallas JE (2000) MÈtodos multivariados aplicados al an·lisis de datos. MÈxico: Thomson Paraninfo S.A.

- Dassarma, Priya, Coker, James Huse, Valerie Dassarma, Shiladitya. (2010). Halophiles, Industrial Applications. 10.1002/9780470054581.eib439.
- De Lucca, A.J (2007). Harmful Fungi in Both Agriculture and Medicine. Rev. Iberoam. Micol. 24, 3–13.
- DIONISIO-SESE, M.L.; TOBITA, S (2000) Effect of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedling differing in salt tolerance. Journal of Plant Physiology, v.157, p.54- 58.
- Elgharably, A., Nafady, N. A. (2021). Inoculation with Arbuscular mycorrhizae, Penicillium funiculosum and Fusarium oxysporum enhanced wheat growth and nutrient uptake in the saline soil. Rhizosphere, 18, 100345. doi:10.1016/j.rhisph.2021.10034
- Esquivel R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R. y Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnoló-gica de la enzima ACC desaminasa en rizobac-terias, una revisión. Revista Fitotecnia Mexicana, 36(3), 251-258.
- Etesami, H., Emami, S., Alikhani, H. A.. (2017). Potassium solubilizing bacteria (KSB):: Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects A review. Journal of soil science and plant nutrition, 17(4), 897-911. https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005
- Firrincieli, A., Otillar, R., Salamov, A., Schmutz, J., Khan, Z., Redman, R. S., … Doty, S. L. (2015). Genome sequence of the plant growth promoting endophytic yeast Rhodotorula graminis WP1. Frontiers in Microbiology, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00978
- Gaballah M.S. , Gomaa A.M., (2004). Performance of Faba Bean Varieties Grown under Salinity Stress and Biofertilized with Yeast. Journal of Applied Sciences, 4: 93-99.**DOI:** 10.3923/jas.2004.93.99
- Galeano, R. M. S., Franco, D. G., Chaves, P. O., Giannesi, G. C., Masui, D. C., Ruller, R., Corrêa, B. O., da Silva Brasil, M., Zanoelo, F. F. (2021). Plant growth promoting potential of endophytic Aspergillus niger 9-p isolated from native forage grass in Pantanal of Nhecolândia region, Brazil. Rhizosphere, 18, 100332. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100332
- García, Adriana, Rhoden, Sandro A, Rubin Filho, Celso J, Nakamura, Celso V, Pamphile, João A. (2012). Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant Sapindus saponaria L . and their localization by scanning electron

microscopy. Biological Research, 45(2), 139-148. https://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602012000200006

- Ghilardi, C., Sanmartin Negrete, P., Carelli, A. A., Borroni, V. (2020). Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by Rhodotorula mucilaginosa. Bioresources and Bioprocessing, 7(1). doi:10.1186/s40643-020-00341-7
- Gomaa, A.M. Gaballah M. S., Hazaa M.M. (2005). Changes in Compatible Solutes of Some Maize Varieties Grown in Sandy Soil and Biofertilized with Rhodotorula glutinis under Saline Conditions. Journal of Applied Sciences Research 1(5): 347-351, 2005
- Gómez L. (2011). Evaluación del cultivo de rábano (Raphanus sativus L.) bajo diferentes condiciones de fertilización orgánica e inorgánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Gopinath, S. C. B., Hilda, A., Anbu, P. (2005). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. Mycoscience, 46(2), 119–126. doi:10.1007/s10267-004-0221-9
- Gunde, N., Ramos, J., Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. Mycological Research, 113(11), 1231–1241. doi:10.1016/j.mycres.2009.09.002
- Hadas, A (1977). Water uptake and germination of leguminous seeds in soils of changing matrix and osmotic water potential. Journal of Experimental Botany, v.28, p.977-985.
- Hakim Safinah, and Tri W. Yuwati. (2020). "The Use of Fungal Endophyte Penicillium Citrinum On Tree Seedling: Applicability and Limitation." BIO web of conferences, v. 20 ,. pp. 03005. doi: 10.1051/bioconf/20202003005
- Hamedi, J., Mohammadipanah, F., Ventosa, A. (2012). Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. Extremophiles, 17(1), 1–13. doi:10.1007/s00792-012-0493-5
- Hossain, M. M., Sultana, F., Islam, S. (2017). Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF): Phytostimulation and Induced Systemic Resistance. Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives, 135–191. doi:10.1007/978-981-10-6593-4_6

- Hsieh, E. J., Cheng, M. C., and Lin, T. P. (2013). Functional characterization of an abiotic stress-inducible transcription factor AtERF53 in Arabidopsis thaliana. Plant Mol. Biol. 82, 223–237. doi: 10.1007/s11103-013-0054-z
- Ibrar, M., Ullah, M. W., Manan, S., Farooq, U., Rafiq, M., Hasan, F. (2020). Fungi from the extremes of life: an untapped treasure for bioactive compounds. Applied Microbiology and Biotechnology. doi:10.1007/s00253-020-10399-0
- IDEAM. (2017). Mapa Nacional de degradación de suelos por salinización. Recuperado de: http://www.ideam.gov.co/documents/24277/69989379/Lanzamiento+mapa+Salinizacion+FN+OPT.pdf/624515d0-799d-41ef-b1ef-bb7e868680f3
- Isayenkov, S. V. (2012). Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. Cytology and Genetics, 46(5), 302–318. doi:10.3103/s0095452712050040
- Islam, N.F. Borthakur SK. (2012). Screening of mycota associated with Aijung rice seed and their effects on seed germination and seedling vigour. Plant Pathology Quarantine — Doi 10.5943/ppq/2/1/11
- Islam, S., Akanda, A. M., Sultana, F., Hossain, M. M. (2013). Chilli rhizosphere fungusAspergillusspp. PPA1 promotes vegetative growth of cucumber (Cucumis sativus) plants upon root colonisation. Archives Of Phytopathology And Plant Protection, 47(10), 1231–1238. doi:10.1080/03235408.2013.83763
- Jafarinia, Mojtaba Shariati, Mahmoud. (2012). Effects of salt stress on photosystem II of canola plant (Brassica napus L.) probing by chlorophyll a fluorescence measurements. Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science. 36. 73-76.
- Jamil, M., K.J. Lee, J.M. Kim, H.S. Kim, E.S. Rha. (2007). Salinity reduced growth PS2 photochemistry and chlorophyll content in radish. Sci. Agricola 64(2), 111-118. Doi: 10.1590/S0103-90162007000200002
- Javed, A., Khan, S.A., Shah, A.H., Hussain, A., Shinwari, Z.K. (2020). Potential of endophytic fungus aspergillus terreus as potent plant growth promoter. Pakistan Journal of Botany, 52(3), 1083-1086.
- Kasim, W.A., K.M. Saad-Allah and M. Hamouda, (2016). Seed priming with extracts of two seaweeds alleviates the physiological and

molecular impacts of salinity stress on radish (Raphanus sativus). Int. J. Agric. Biol., 18: 653–660

- Khan MI, Ali N, Jan G, Hamayun M, Jan FG, Iqbal A, Hussain A, Lee IJ (2022). Salt Stress Alleviation in Triticum aestivum Through Primary and Secondary Metabolites Modulation by Aspergillus terreus BTK-1. Front Plant Sci. Mar 10;13:779623. doi: 10.3389/fpls.2022.779623. PMID: 35360328; PMCID: PMC8960994.
- Khan SA, Hamayun M, Hyeokjun Y, Kim H, Suh S, Hwang S, Kim J, Lee I, Choo Y,YoonU, et al. (2008) Plant growth promotion and Penicillium citrinum. BMC Microbiol. 8:231.
- Khan, A. L., Hamayun, M., Kim, Y.-H., Kang, S.-M., Lee, I.-J. (2011). Ameliorative symbiosis of endophyte (Penicillium funiculosum LHL06) under salt stress elevated plant growth of Glycine max L. Plant Physiology and Biochemistry, 49(8), 852–861. doi:10.1016/j.plaphy.2011.03.005
- Khan, A. L., Hamayun, M., Kim, Y.-H., Kang, S.-M., Lee, J.-H., Lee, I.-J. (2011). Gibberellins producing endophytic Aspergillus fumigatus sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. Process Biochemistry, 46(2), 440–447. doi:10.1016/j.procbio.2010.09.0
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahmad, E. (2014). Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms. Phosphate Solubilizing Microorganisms, 31–62. doi:10.1007/978-3-319-08216-5_2
- Khushdil, F., Jan, F. G., Jan, G., Hamayun, M., Iqbal, A., Hussain, A., Bibi, N. (2019). Salt stress alleviation in Pennisetum glaucum through secondary metabolites modulation by Aspergillus terreus L. Plant Physiology and Biochemistry, 144, 127–134. doi:10.1016/j.plaphy.2019.09.038
- KURAMATA, M., FUJIOKA, S., SHIMADA, A., KAWANO, T., KIMURA, Y. (2007). Citrinolactones A, B and C, and Sclerotinin C, Plant Growth Regulators fromPenicillium citrinum. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 71(2), 499–503. doi:10.1271/bbb.60538

- Kurjogi, K.N. Basavesha, V.P. Savalgi (2021) Impact of potassium solubilizing fungi as biopesticides and its role in crop improvement, Biocontrol Agents and Secondary Metabolites. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822919-4.00002-8.
- Kurtzman C.P., J.W. Fell, Teun Boekhout (2011). The Yeast A taxonomic study. Elsevier. P 1973-1906.
- Li X, Zhao C, Zhang T, Wang G, Amombo E, Xie Y and Fu J (2021) Exogenous Aspergillus aculeatus Enhances Drought and Heat Tolerance of Perennial Ryegrass. Front. Microbiol. 12:593722. doi: 10.3389/fmicb.2021.593722
- Lian, B., Wang, B., Pan, M., Liu, C., Teng, H. H. (2008). Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus Aspergillus fumigatus. Geochimica et Cosmochimica Acta, 72(1), 87–98. doi:10.1016/j.gca.2007.10.005
- Liu, Z.; Cheng, R.; Xiao, W.; Guo, Q.; Wang, N. (2014) Effect of off-season flooding on growth, photosynthesis, carbohydrate partitioning, and nutrient uptake in Distylium chinense. PLoS ONE 9, 1–9.
- Lubna, Asaf, S., Hamayun, M., Khan, A. L., Waqas, M., Khan, M. A., … Hussain, A. (2018). Salt tolerance of Glycine max .L induced by endophytic fungus Aspergillus flavus CSH1, via regulating its endogenous hormones and antioxidative system. Plant Physiology and Biochemistry, 128, 13–23. doi:10.1016/j.plaphy.2018.05.00
- Lugtenberg B, Kamilova F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu Rev Microbiol.;63:541-56. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918. PMID: 19575558.
- Ma Y. , Erwin A. Galinski , William D. Grant , Aharon Oren , and Antonio Ventosa (2010) Halophiles 2010: Life in Saline Environments. ASM journals. Doi: https://doi.org/10.1128/AEM.01868-10
- Machuca, A., Milagres, A. M. F. (2003). Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by

Aspergillus. Letters in Applied Microbiology, 36(3), 177–181. doi:10.1046/j.1472-765x.2003.012

- Maheshwari, D. K., Saraf, M. (2015). Halophiles. Sustainable Development and Biodiversity. doi:10.1007/978-3-319-14595-2
- Marcelis, L., Van Hooijdonk, J. (1999) Effect of salinity on growth, water use and nutrient use in radish (Raphanus sativus L.). Plant and Soil **215,** 57–64. https://doi.org/10.1023/A:1004742713538.
- Mathur, P., Chaturvedi, P., Sharma, C. (2022). Improved seed germination and plant growth mediated by compounds synthesized by endophytic Aspergillus niger (isolate 29) isolated from Albizia lebbeck (L.) Benth. 3 Biotech **12**, 271. https://doi.org/10.1007/s13205-022-03332-x
- Maxwell, K.; Johnson, G (2000). Chlorophyll fluorescence—A practical guide. J. Exp. Bot. 51, 659–668
- Melgarejo L. (2010) Libro de experimentos en fisiología vegetal. Universidad Nacional de Colombia. 1ra ed. Bogotá, Colombia.
- Membrillera, José (1950). Clave determinativa de las especies del género penicillium. Murcia: Universidad de Murcia, Servicio de Publicaciones. Tomado de: http://hdl.handle.net/10201/6407
- Membrillera, José (1951). Clave determinativa de las especies del género aspergillus. Murcia: Universidad de Murcia, Servicio de Publicaciones. Tomado de: http://hdl.handle.net/10201/6407
- Mendes, G.O.; Galvez, A.; Vassileva, M.; Vassilev, N (2017). Fermentation Liquid Containing Microbially Solubilized P Significantly Improved Plant Growth and P Uptake in Both Soil and Soilless Experiments. Appl. Soil Ecol. 2017, 117, 208–211
- Mittal, V., Singh, O., Nayyar, H., Kaur, J., Tewari, R. (2008). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (Aspergillus awamori and Penicillium citrinum) on the yield of chickpea (Cicer arietinum L. cv. GPF2). Soil Biology and Biochemistry, 40(3), 718–727. doi:10.1016/j.soilbio.2007.10.0
- Mohamed, H. M., El-Homosy, R. F., Abd-Ellatef, A.-E. H., Salh, F. M., Hussein, M. Y. (2016). Identification of Yeast Strains Isolated from Agricultural Soils for

Releasing Potassium-bearing Minerals. Geomicrobiology Journal, 34(3), 261–266. doi:10.1080/01490451.2016.11867

- Monica Boscaiu, Cristina Lull, Josep Llinares, Oscar Vicente, Herminio Boira (2013) Proline as a biochemical marker in relation to the ecology of two halophytic Juncus species, Journal of Plant Ecology, Volume 6, Issue 2, Pages 177–186, https://doi.org/10.1093/jpe/rts017
- Moreno-C, Lina Margarita, López-Casallas, Marcela, Cruz Barrera, Fredy Mauricio. (2021). Phosphate solubilization by Burkholderia species isolated from Oxisols from the Colombian high plains. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 22(2), Epub May 01, 2021.https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1897
- Moukhtari, A., Cabassa-Hourton, C., Farissi, M., Savouré, A. (2020). How Does Proline Treatment Promote Salt Stress Tolerance During Crop Plant Development? Frontiers in Plant Science, 11. doi:10.3389/fpls.2020.01127
- Moukhtari, A., Farissi, M., Savouré, A. (2019). How Does Proline Treatment Promote Salt Stress Tolerance During Crop Plant Development?. Frontiers in Plant Science. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01127
- Mrudula S, Murugammal R. (2011) Production of cellulose by Aspergillus niger under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. Braz J Microbiol. Jul;42(3):1119-27. doi: 10.1590/S1517-838220110003000033. Epub 2011 Sep 1. PMID: 24031730; PMCID: PMC3768773.
- Mujica Y, Sales J. (2013). Funcionamiento de la inoculación líquida con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plantas de tomate (Solanum lycopersicum L.). Cultivos Tropicales, 34(4), 5-8. Recuperado en 16 de noviembre de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext pid=S0258-59362013000400001 lng=es tlng=es.
- Mundra, S., Arora, R., Stobdan, T. (2011). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, Rhodotorula sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(10), 2387–2396. doi:10.1007/s11274-011-0708-4

- Murali, M., Sudisha, J., Amruthesh, K. N., Ito, S.-I., Shetty, H. S. (2012). Rhizosphere fungusPenicillium chrysogenumpromotes growth and induces defence-related genes and downy mildew disease resistance in pearl millet. Plant Biology, 15(1), 111–118. doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00617.x
- Muthukumarasamy, M., Gupta, S.D. Panneerselvam, R. (2000) Influence of Triadimefon on the Metabolism of NaCl Stressed Radish. Biologia Plantarum **43**, 67–72. https://doi.org/10.1023/A:1026503013445
- Netondo, G. W., Onyango, J. C., Beck, E. (2004). Sorghum and Salinity. Crop Science, 44(3), 806. doi:10.2135/cropsci2004.8060
- Niehus, R., Picot, A., Oliveira, N. M., Mitri, S., Foster, K. R. (2017). The evolution of siderophore production as a competitive trait. Evolution, 71(6), 1443–1455. doi:10.1111/evo.13230
- Okabe, M.; Lies, D.; Kanamasa, S.; Park, E.Y. (2009) Biotechnological Production of Itaconic Acid and Its Biosynthesis in Aspergillus terreus. App. Microbiol. Biotechnol. 84, 597–606.
- Olivera Viciedo, D., Mello Prado, R., Lizcano Toledo, R., Salas Aguilar, D., Claudio Nascimento dos Santos, L., Calero Hurtado, A., … Betancourt Aguilar, C. (2020). Physiological role of silicon in radish seedlings under ammonium toxicity. Journal of the Science of Food and Agriculture. doi:10.1002/jsfa.10587
- Oren A (2002) Diversity of halophilic microorganisms: enviroments, phylogeny, physiology and application. J Ind Microbiol Biotechnol 28:56–63
- Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environmental Technology, 31(8-9), 825–834. doi:10.1080/09593330903370026
- Pandey, A., Das, N., Kumar, B., Rinu, K., Trivedi, P. (2007). Phosphate solubilization by Penicillium spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(1), 97–102. doi:10.1007/s11274-007-9444-1
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. (2014). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. Environmental Science and Pollution Research, 22(6), 4056–4075. doi:10.1007/s11356-014-3739-1

- Parmar, S., Gharat, S. A., Tagirasa, R., Chandra, T., Behera, L., Dash, S. K., Shaw, B. P. (2020). Identification and expression analysis of miRNAs and elucidation of their role in salt tolerance in rice varieties susceptible and tolerant to salinity. PLOS ONE, 15(4), e0230958. doi:10.1371/journal.pone.0230958
- Patil, R.H.; Patil, M.P.; Maheshwari, V.L. (2016) Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic Fungi: A Review of Biotechnological Production and Their Potential Applications. Stud. Nat. Prod. Chem. 49, 189–205.
- Pazouki, M. & Felse, PA & Sinha, Jayashy & Panda, Tapobrata. (2000). Comparative studies on citric acid production by Aspergillus niger and Candida lipolytica using molasses and glucose. Bioprocess Engineering. 22. 353-361. 10.1007/PL00009115.
- Penrose, D. M., Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum, 118(1), 10–15. doi:10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x
- Perrone, G., Gallo, A. (2016). Aspergillus Species and Their Associated Mycotoxins. Mycotoxigenic Fungi, 33–49. doi:10.1007/978-1-4939-6707-0_3
- Pi, HW., Anandharaj, M., Kao, YY. (2018). Engineering the oleaginous red yeast Rhodotorula glutinis for simultaneous β-carotene and cellulase production. Sci Rep **8**, 10850 https://doi.org/10.1038/s41598-018-29194-z
- Pikovskaya, R.I., (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17, 362–370.
- Putti, F.F., J.F. Silva Junior, R. Ludwig, L.R.A. Gabriel Filho, C.P.Cremasco, and A.E. Klar. (2014). Avaliacao da cultura do rabanete ao longo do ciclo submetido em diferentes niveis de salinidade. J. Agron. Sci. 3(2), p. 80-90.
- Qadir M, Quillerou E, Nangia V, Murtaza G, Singh M, Thomas RJ, Drechsel P, Noble AD (2014) Economics of salt-induced land degradation and restoration. Nat Res Forum 38(4):282–295
- Ramos-G, J., Bustamante-Brito, R., Ángeles de Paz, G., Medina-Canales, M. G., Vásquez-Murrieta, M. S., Wang, E. T., Rodríguez-Tovar, A. V. (2016). Isolation and characterization of yeasts associated with plants growing in

heavy-metal- and arsenic-contaminated soils. Canadian Journal of Microbiology, 62(4), 307–319. doi:10.1139/cjm-2015-0226

- Romero A. (2020). Caracterización de microorganismos halófilos y halotolerantes con potencial actividad promotora de crecimiento vegetal de la mina de sal de Zipaquirá (Colombia). Tesis de pregrado. Universidad INCCA, Bogotá, Colombia.
- Sah, Stuti, Singh, Rajni. (2015) "Siderophore: Structural And Functional Characterisation – A Comprehensive Review" Agriculture (vol.61, no.3, 2015, pp.97-114. https://doi.org/10.1515/agri-2015-0015
- Salazar-Garcia G, Balaguera-Lopez HE, Hernandez JP.(2022). Effect of Plant Growth-Promoting Bacteria Azospirillum brasilense on the Physiology of Radish (Raphanus sativus L.) under Waterlogging Stress. Agronomy. 12(3):726. https://doi.org/10.3390/agronomy12030726
- Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, Z. A., Nadeem, S. M., Yaseen, M., Meena, H. N. (2018). Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. Applied Soil Ecology. doi:10.1016/j.apsoil.2018.09.012
- Shahid, S. A., Zaman, M., Heng, L. (2018). Soil Salinity: Historical Perspectives and a World Overview of the Problem. Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques, 43–53. doi:10.1007/978-3-319-96190-3
- Sharma, P.K., and D.O. Hall. (1991). Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum. J. Plant Physiol. 138:614–619.
- Shilev, S., Sancho, E. D., Benlloch-González, M. (2012). Rhizospheric bacteria alleviate salt-produced stress in sunflower. Journal of Environmental Management, 95, S37–S41. doi:10.1016/j.jenvman.2010.07.019
- Shirinbayan, S., Khosravi, H., Malakouti, M. J. (2019). Alleviation of drought stress in maize (Zea mays) by inoculation with Azotobacter strains isolated from semi-arid regions. Applied Soil Ecology, 133, 138-145. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.015

- Sidari M, Carmelo Mallamaci, Adele Muscolo (2008) Drought, salinity and heat differently affect seed germination of Pinus pinea, Journal of Forest Research, 13:5, 326-330, DOI: 10.1007/s10310-008-0086-4
- Signorelli, S. (2016). The fermentation analogy: a point of view for understanding
  the intriguing role of proline accumulation in stressed plants. Front. Plant Sci. 7:1339. doi: 10.3389/fpls.2016.01339
- Silambarasan S, Logeswari P, Vangnai AS, Cornejo P. (2022). Rhodotorula mucilaginosa CAM4 improved selenium uptake in Spinacia oleracea L. and soil enzymatic activities under abiotic stresses. Environ Sci Pollut Res Int. . doi: 10.1007/s11356-022-21935-y. Epub ahead of print. PMID: 35859235.
- Silambarasan, S., Logeswari, P., Cornejo, P., Kannan, V. R. (2018). Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast Rhodotorula sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions. International Journal of Biological Macromolecules. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.016
- Sousa L, Basílio A, Da Silva T, De Moura J, Gonçalves A, De Melo J, Dias T. (2018). Radish (Raphanus sativus L.) morphophysiology under salinity stress and ascorbic acid treatments. Agronomía Colombiana, 36(3), 257–265. doi: 10.15446/agron.colomb.v36n3.74149
- Sreevidya, M., Gopalakrishnan, S., Melø, T. M., Simic, N., Bruheim, P., Sharma, M., … Alekhya, G. (2015). Biological control ofBotrytis cinereaand plant growth promotion potential byPenicillium citrinumin chickpea (Cicer arietinumL.). Biocontrol Science and Technology, 25(7), 739–755. doi:10.1080/09583157.2015.10104
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A.: Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. - In: Papageorgiou (2004): Chlorophyll a Fluorescence. Pp. 321-362. Springer, Berlin.
- Taiz L, Zeiger E (2015) Plant physiology. 6th ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 764 pp.
- Tanaka M, Taniguchi M, Morinaga T, Matsuno R, Kamikubo T (1980) Cellulase productivity of Eupenicillium javanicum. J Ferment Technol 58:149–154

- Tapia-Vázquez, I., Sánchez-Cruz, R., Arroyo-Domínguez, M., Lira-Ruan, V., Sánchez-Reyes, A., del Rayo Sánchez-Carbente, M., Padilla-Chacón, D., Batista-García, R. A., Folch-Mallol, J. L. (2020). Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in Mexico. Microbiological Research, 232, 126394. https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126394
- Teather, R., & Wood, P. (1982). Use of Congo redpolysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Applied Environmental Microbiology, 43(4), 777–780.
- Ting, A. S. Y., Mah, S. W., Tee, C. S. (2012). Evaluating the feasibility of induced host resistance by endophytic isolate Penicillium citrinum BTF08 as a control mechanism for Fusarium wilt in banana plantlets. Biological Control, 61(2), 155–159. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.01.010
- Vashisth A., S. Nagarajan. (2010) Effect on germination and early growth characteristics in sunflower (Helianthus annuus) seeds exposed to static magnetic field. Journal of Plant Physiology ;167:149–156.
- Vassileva, M.; Malusá, E.; Eichler-Löbermann, B.; Vassilev, N. (2020) Aspegillus terreus: From Soil to Industry and Back. Microorganisms, 8, 1655. https://doi.org/10.3390/microorganisms8111655
- Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Yu, J.W., Hemavathi, A., Kim, D.H., Strasser, R.J., Park, S.W. (2012) Chlorophyll a fluorescence transient analysis of transgenic potato overexpressing D-galacturonic acid reductase gene for salinity stress tolerance. -Hort. Environ. Biotechnol. 53: 320-328.
- Verslues, P. E., and Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for
  plant-environment interaction. Arabidopsis Book, Vol. 8. (American Society of Plant Biologists), e0140. doi: 10.1199/tab.0140
- Waqas, M., Khan, A. L., Hamayun, M., Shahzad, R., Kang, S.-M., Kim, J.-G., Lee, I.-J. (2015). Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: an example ofPenicillium citrinumandAspergillus terreus. Journal of Plant Interactions, 10(1), 280–287. doi:10.1080/17429145.2015.107974

- Yan J, Hiroyuki ITO, Hirokazu MATSUI, Mamoru HONMA (2000). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase Induced by ACC Synthesized and Accumulated in Penicillium citrinum Intracellular Spaces, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Volume 64, Issue 2, Pages 299–305, https://doi.org/10.1271/bbb.64.299
- Yang, S. F., and Hoffman, N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35, 155–189. doi: 10.1146/annurev.pp.35.060184.001103
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I., (1999). Induction of defense responses in cucumber
- Yildirim E, Ertan T, Metin D (2008). Mitigation of salt stress in radish (Raphanus sativus L.) by plant growth: Promoting rhizobacteria. Romanian Biotechnological Letters. 13. 3933-3943.
- Yin, J., Chen, J.-C., Wu, Q., Chen, G.-Q. (2015). Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. Biotechnology Advances, 33(7), 1433–1442. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.1
- Yoo, S.J.; Shin, D.J.; Won, H.Y.; Song, J.; Sang, M.K (2018) Aspergillus terreus JF27 Promotes the Growth of Tomato Plants and Induces Resistance against Pseudomonas Syringae Pv. Tomato. Mycobiology 46, 147–153.
- Zhang, H., Wang, L., Ma, L., Dong, Y., Jiang, S., Xu, B., Zheng, X. (2009). Biocontrol of major postharvest pathogens on apple using Rhodotorula glutinis and its effects on postharvest quality parameters. Biological Control, 48(1), 79–83. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.09.
- Zhao, G. Q., Ma, B. L., Ren, C. Z. (2007). Growth, Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence, and Ion Content of Naked Oat in Response to Salinity. Crop Science, 47(1), 123. doi:10.2135/cropsci2006.06.0371
- Zushi, K., Kajiwara, S., Matsuzoe, (2012) Chlorophyll a fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit. - Sci. Hort. 148: 39-46