

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

**EFFECTO DE *Trichoderma asperellum* EN PLANTAS  
DE *Capsicum* spp. EXPUESTAS A NaCl**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**PRESENTA:**

I.B.Q. NORELI ISABEL MARTÍNEZ PALACIOS

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dra. NANCY RUIZ LAU

**CO-DIRECTOR**

Dr. JAIRO CRISTÓBAL ALEJO

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.

JUNIO 2020



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas **06/julio/2020.**

OFICIO No. DEPI-444/2020.

**C. I.B.Q. NORELI ISABEL MARTINEZ PALACIOS  
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ  
PRESENTE.**

Habiendo recibido la comunicación, por parte de los CC. DRA. NANCY RUÍZ LAU, DR. JAIRO CRISTOBAL ALEJODR. JOAQUIN ADOLFO MONTES MOLINA, DR. FEDERICO ANTONIO GUTIERREZ MICELI. En el sentido, de que se encuentra satisfactorio el contenido de la tesis denominada "EFECTO DE *Trichoderma asperellum* EN PLANTAS DE *Capsicum sp.* EXPUESTAS A NaCl", elaborada por usted, como prueba escrita para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica, AUTORIZAMOS a que se proceda a la impresión de la misma.

SIN MAS POR EL MOMENTO ENVIO UN CORDIAL SALUDO.

ATENTAMENTE.

*Excelencia en Educación Tecnológica  
"Ciencia y Tecnología con Sentido Humano"*

Vo. Bo.

**DR. JUAN JOSÉ VILLALOBOS  
MALDONADO**

**JEFE DE LA DIVISION DE POSGRADO E  
INVESTIGACION.**



**M.C. JOSÉ MANUEL ROSADO PÉREZ  
DIRECTOR.**

SECRETARÍA DE EDUCACION  
PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE Tuxtla Gutiérrez  
DIVISION DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACION

C.c.p. Servicios escolares  
C.c.p. Archivo



## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada (No. 888692) para la culminación exitosa de los estudios de maestría.

Al **Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG)** por la formación académica y uso de las instalaciones, al laboratorio de cultivo de tejidos y laboratorios 3, 10 y 12 del Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas en Biocombustibles, por las facilidades otorgadas al elaborar cada ensayo de este trabajo.

A mi directora de tesis, la **Dra. Nancy Ruiz Lau** por la confianza de permitirme formar parte de su proyecto, por su amistad, paciencia y apoyo académico brindado a lo largo del proceso y terminación del trabajo.

Al comité revisor integrado por el **Dr. Joaquín Adolfo Montes Molina** y **Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli** por su apoyo y colaboración en la realización de esta investigación.

Al **Dr. Jairo Cristóbal Alejo** por el suministro de la cepa Ta 13-17 de *Trichoderma asperellum* y su apoyo en la revisión de la tesis.

Al **Dr. Jesús Emanuel de A. Bojórquez Quintal** por el apoyo y orientación en el trabajo.

A la **M.C. María de Fátima Medina Lara** por el apoyo técnico en la estancia de investigación.

A los **Compañeros del posgrado y compañeros universitarios** que no he mencionado y que me han brindado su apoyo.

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios**

Por ser mi creador y sustentador, mi fuente inagotable de sabiduría, la luz que guía mi camino.

### **A mi padre**

Por estar siempre a mi lado con su amor ilimitado, apoyándome moral y económicamente.  
Quien ha sido mi ejemplo de superación a lo largo de toda mi vida.

### **A mi madre**

Quien me regalo la vida, y ha dado todo por sus hijas. Por su entrega inmensurable, apoyo y dedicación absoluta en cada uno de mis pasos y su amor que es mi mayor fuente de energía.

### **A mi hermana**

Daniela, quien a pesar de la distancia siempre está presente en mi vida, con sus palabras de consuelo, consejos y ánimo, por motivarme a ser mejor persona y consentirme.

### **A Adrian**

Con quien he tenido la dicha de vivir esta etapa. Mi compañero de vida y profesión, de quien aprendí que donde hay unidad hay victoria. Por su apoyo incondicional en los momentos de tensión y cansancio, por la alegría con que amenizó mis dificultades y su compañía minuto a minuto hasta llegar a la meta.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
ÍNDICE DE CUADROS .....	VI
RESUMEN .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
INTRODUCCIÓN .....	10
CAPÍTULO I .....	11
ANTECEDENTES.....	11
1.1 Estrés por salinidad en la agricultura.....	11
1.2 Efecto del estrés salino en las plantas.....	11
1.2.1 Estrés osmótico.....	13
1.2.2 Estrés iónico.....	13
1.2.3 Estrés oxidativo .....	14
1.3 Estrategias de tolerancia al estrés salino en plantas.....	14
1.3.1 Entrada y salida de Na <sup>+</sup> en la célula.....	16
1.3.3 Compartimentalización de Na <sup>+</sup> en la vacuola.....	17
1.3.4 Mantener una alta relación K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> .....	18
1.3.5 Traslocación de Na <sup>+</sup> .....	18
1.3.6. Síntesis de solutos compatibles .....	19
1.4 Uso de microorganismos para la tolerancia al estrés abiótico.....	20
1.5 <i>Trichoderma</i> spp. como estrategia contra el estrés salino .....	21
1.6 Importancia agrícola de <i>Trichoderma</i> spp. ....	22
1.7 El género <i>Capsicum</i> spp.....	23
OBJETIVOS.....	27
1.2.1. GENERAL.....	27
1.2.2. ESPECÍFICOS.....	27
JUSTIFICACIÓN .....	28
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	29
CAPÍTULO II.....	30

Establecimiento del rango de tolerancia a NaCl de <i>Trichoderma asperellum</i> y sus efectos sobre el crecimiento micelial y esporulación.....	30
<b>2.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
2.3.1. Material biológico .....	32
2.3.2. Preparación del inóculo.....	32
2.3.3. Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>T. asperellum</i> en presencia de NaCl.....	32
2.3.4 Diseño experimental .....	33
<b>2.4 RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.5 DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
<b>2.6 CONCLUSIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>46</b>
Efecto del NaCl en el crecimiento del sistema radicular de plántulas de chile ( <i>Capsicum spp.</i> ) en un modelo <i>in vitro</i> .....	46
<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>46</b>
<b>3.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
3.3.1. Material vegetal.....	48
3.3.2. Desinfección y germinación de semillas .....	48
3.3.3. Tratamientos con NaCl .....	48
3.3.4. Diseño experimental .....	49
<b>3.4 RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
<b>3.5 DISCUSIÓN</b> .....	<b>55</b>
<b>3.6 CONCLUSIONES</b> .....	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>60</b>
Efecto de <i>Trichoderma asperellum</i> sobre las variables de crecimiento de plantas de chile ( <i>Capsicum spp.</i> ) bajo estrés salino inducido por NaCl .....	60
<b>4.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>60</b>
<b>4.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>61</b>
<b>4.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
4.3.1. Preparación de inóculo de <i>Trichoderma asperellum</i> .....	62

<b>4.3.2. Material vegetal.....</b>	<b>62</b>
<b>4.3.3. Trasplante e inoculación .....</b>	<b>62</b>
<b>4.3.4. Aplicación de tratamientos de estrés salino.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.6. Evaluación de las variables de crecimiento .....</b>	<b>63</b>
<b>4.4 RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>4.5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>70</b>
<b>4.6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Resumen esquemático del estrés salino en plantas y las correspondientes respuestas fisiológicas intrínsecas (Adaptado de HanumanthaRao et al., 2016).</b> .....	<b>12</b>
<b>Figura 2. Estrategias de tolerancia al estrés salino en las plantas. Fuente: Bojórquez- Quintal, 2012.</b> .....	<b>15</b>
<b>Figura 3. Municipios productores de chile en Chiapas. Fuente: Elaboración con Datos del Comité Nacional Sistema Producto Chile A.C. (CONAPROCH, 2010).</b> .....	<b>26</b>
<b>Figura 4. Estrategia experimental general</b> .....	<b>29</b>
<b>Figura 5. Estrategia experimental para establecer la tolerancia a la salinidad de <i>T. asperellum</i>.</b> 31	
<b>Figura 6. Crecimiento de <i>Trichoderma asperellum</i> en medio PDA adicionado con 0, 1, 3 y 5 M de NaCl a las 96 hdi con disco micelial.</b> .....	<b>34</b>
<b>Figura 7. Crecimiento de <i>Trichoderma asperellum</i> en medio PDA adicionado con 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl a las 96 hdi del experimento.</b> .....	<b>36</b>
<b>Figura 8. Concentración de conidios de <i>Trichoderma asperellum</i>, a partir de micelio. (Vista microscópica. A: 0 M de NaCl y B: 1 M de NaCl)</b> .....	<b>37</b>
<b>Figura 9. Crecimiento de <i>Trichoderma asperellum</i> en medio PDA adicionado con 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl e inoculado con 20 µL de una solución de conidios.</b> .....	<b>38</b>
<b>Figura 10. Estrategia experimental para evaluar el efecto de la salinidad en el sistema radicular las plántulas de chile (<i>Capsicum spp.</i>)</b> .....	<b>47</b>
<b>Figura 11. Efecto del NaCl en el sistema radicular de plántulas de <i>Capsicum spp.</i></b> .....	<b>52</b>
<b>Figura 12. Fotografías de los ensayos al finalizar el experimento</b> .....	<b>54</b>
<b>Figura 13. Estrategia experimental para determinar el efecto de <i>T. asperellum</i> sobre plantas de chile bajo estrés salino por NaCl.</b> .....	<b>61</b>
<b>Figura 14. Síntomas relacionados con el estrés salino en plantas de <i>Capsicum spp.</i></b> .....	<b>65</b>
<b>Figura 15. Efecto de <i>T. asperellum</i> en la altura de la parte aérea en plantas de <i>Capsicum spp.</i> expuestas a estrés salino por NaCl.</b> .....	<b>66</b>



<b>Figura 16. Efecto de <i>T. asperellum</i> en la longitud de la raíz en plantas de <i>Capsicum</i> spp. expuestas a estrés salino por NaCl. Tratamientos: — Control: Sin <i>T. asperellum</i> (Ta 13-17) y sin sal, — Tricho: <i>T. asperellum</i> (Ta 13-17) [1 x10<sup>6</sup> conidios mL<sup>-1</sup>], — NaCl: 150 mM y — Tricho + NaCl: 150 mM NaCl + <i>T. asperellum</i> (Ta 13-17) [1 x10<sup>6</sup> conidios mL<sup>-1</sup>].</b>	<b>66</b>
<b>Figura 17. Efecto de <i>T. asperellum</i> en el peso seco de la parte aérea en plantas de <i>Capsicum</i> spp. expuestas a estrés salino por NaCl.</b>	<b>67</b>
<b>Figura 18. Efecto de <i>T. asperellum</i> en el peso seco de la raíz en plantas de <i>Capsicum</i> spp. expuestas a estrés salino por NaCl. Tratamientos: — Control: Sin <i>T. asperellum</i> (Ta 13-17) y sin sal, — Tricho: <i>T. asperellum</i> (Ta 13-17) [1 x10<sup>6</sup> conidios mL<sup>-1</sup>], — NaCl: 150 mM y — Tricho + NaCl: 150 mM NaCl + <i>T. asperellum</i> (Ta 13-17) [1 x10<sup>6</sup> conidios mL<sup>-1</sup>].</b>	<b>67</b>
<b>Figura 19. Efecto de <i>T. asperellum</i> sobre el contenido de clorofila en plantas de <i>Capsicum</i> spp. expuestas a estrés salino por NaCl.</b>	<b>68</b>
<b>Figura 20. Diferencias morfológicas, sensibilidad al estrés salino y a la aplicación de <i>T. asperellum</i> (Ta 13-17) en las plantas de <i>Capsicum</i> spp. Tratamientos de izq. a der.: Control, Tricho, NaCl y Tricho+NaCl.</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Funciones ecológicas de <i>Trichoderma</i> spp. en la interacción con las plantas.....	22
Cuadro 2. Clasificación taxonómica del género <i>Capsicum</i> . .....	24
Cuadro 3. Diámetro de crecimiento del micelio (mm) de <i>T. asperellum</i> a concentraciones de 0, 1, 3, y 5 M de NaCl.....	34
Cuadro 4. Inhibición de Crecimiento Radial (%) de <i>T. asperellum</i> a concentraciones de 0, 1, 3 y 5 M de NaCl. ....	35
Cuadro 5. Formación de conidios (conidios mL <sup>-1</sup> ) de <i>T. asperellum</i> cultivado a las concentraciones de 0, 1, 3 y 5 M de NaCl durante 120 h. ....	35
Cuadro 6. Crecimiento del micelio (mm) de <i>T. asperellum</i> a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl inoculado con disco micelial.....	36
Cuadro 7. Inhibición de Crecimiento Radial (%) de <i>T. asperellum</i> a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl inoculado con disco micelial.....	37
Cuadro 8. Formación de conidios (conidios mL <sup>-1</sup> ) de <i>T. asperellum</i> cultivado a las concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl inoculado con disco micelial. ....	37
Cuadro 9. Crecimiento del micelio (mm) de <i>T. asperellum</i> a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl inoculado con 20 µL de una solución de conidios. ....	38
Cuadro 10. Inhibición de Crecimiento Radial (%) de <i>T. asperellum</i> a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl inoculados con 20 µL de una solución de conidios [3.38 x10 <sup>6</sup> conidios mL <sup>-1</sup> ].	39
Cuadro 11. Efecto de concentraciones de NaCl (mm) en el crecimiento de la raíz principal de plántulas de <i>Capsicum</i> spp.....	50
Cuadro 12. Efectos de tratamientos en la inhibición de crecimiento de la raíz principal (%).....	51
Cuadro 13. Efecto de tratamientos en la formación de raíces laterales en plántulas de <i>Capsicum</i> spp.....	52
Cuadro 14. Efecto de tratamientos en el porcentaje de plántulas de <i>Capsicum</i> spp. con raíces laterales. ....	53
Cuadro 15. Efecto de tratamientos en el peso fresco de plántulas de <i>Capsicum</i> spp. ....	53

**Cuadro 16. Tratamientos aplicados en *Capsicum* spp. .... 63**

**Cuadro 17. Efecto benéfico de *T. asperellum* (Ta 13-17) en plantas de *Capsicum* spp. expuestas a NaCl ..... 68**

## RESUMEN

La salinización provoca la pérdida de la producción y reducción del área destinada para los cultivos. Esta problemática, lleva a la necesidad de identificar cultivos tolerantes y/o herramientas que permitan mejorarlos. Una estrategia implementada para mejorar el crecimiento, el desarrollo y la adaptación al estrés biótico y abiótico ha sido el uso de microorganismos tales como *Trichoderma* spp., el cual ha demostrado ser un hongo que puede ayudar a las plantas a mitigar el estrés salino. Como modelo de estudio se utilizó el género *Capsicum* ya que es considerado como moderadamente sensible o sensible a la salinidad y se ha demostrado que esta tolerancia puede ser diferente en variedades de la misma especie. El objetivo del proyecto fue determinar el efecto de *Trichoderma* spp. sobre *Capsicum* spp. bajo condiciones de salinidad. Primeramente, se estableció el rango de tolerancia a NaCl de *T. asperellum*, las variables de respuesta fueron el diámetro de crecimiento, el porcentaje de inhibición radial y la esporulación. Posteriormente, se evaluó el efecto del NaCl sobre el desarrollo del sistema radicular de plántulas de chile siete caldos y habanero criollo (*C. frutescens* y *C. chinense*) y finalmente, el efecto de *T. asperellum* sobre el crecimiento de tres especies de chile: siete caldos, habanero criollo y jalapeño (*C. frutescens*, *C. chinense* y *C. annuum*) expuestas a NaCl. Se encontró desarrollo del micelio a 1 M y germinación de conidios hasta 1.5 M. La salinidad redujo el crecimiento de la raíz principal, número de raíces laterales y peso fresco en plántulas de *Capsicum* spp. habanero criollo fue más sensible a la salinidad por NaCl, y fue en esta especie que la inoculación de *T. asperellum* favoreció a las plantas estresadas en comparación de las plantas estresadas sin el hongo. Las especies de siete caldos y jalapeño no mostraron diferencias ante la presencia de *Trichoderma*. El efecto de la salinidad fue muy variable en cada especie de la *Capsicum* spp.

## ABSTRACT

Salinization causes the loss of production and reduction of the area destined for crops. This problem leads to the need to identify tolerant crops and / or tools to improve them. One strategy implemented to improve growth, development, and adaptation to biotic and abiotic stress has been the use of microorganisms such as *Trichoderma* spp., Which has been shown to be a fungus that can help plants mitigate salt stress. As a study model, the genus *Capsicum* was used since it is considered moderately sensitive or sensitive to salinity and it has been shown that this tolerance may be different in varieties of the same species. The objective of the project was to determine the effect of *Trichoderma* spp. about *Capsicum* spp. under salinity conditions. Firstly, the range of tolerance to *T. asperellum* NaCl was established, the response variables were the growth diameter, the percentage of radial inhibition and sporulation. Subsequently, the effect of NaCl on the development of the root system of seedlings of seven broth and creole habanero (*C. frutescens* and *C. chinense*) was evaluated, and finally, the effect of *T. asperellum* on the growth of three species of chili: seven broths, creole habanero and jalapeño (*C. frutescens*, *C. chinense* and *C. annuum*) exposed to NaCl. Mycelial development was found at 1 M and germination of conidia up to 1.5 M. Salinity reduced the growth of the main root, number of lateral roots and fresh weight in seedlings of *Capsicum* spp. Creole habanero was more sensitive to salinity by NaCl, and it was in this species that the inoculation of *T. asperellum* favored stressed plants compared to stressed plants without the fungus. The seven broth and jalapeño species did not show differences in the presence of *Trichoderma*. The effect of salinity was highly variable in each species of *Capsicum* spp.

## INTRODUCCIÓN

El cambio climático impacta significativamente en la agricultura, principalmente en la producción de alimentos, este impacto es causado por condiciones de estrés ambiental como la sequía, el calor, la salinidad, el frío o la infección de patógenos que puede tener un efecto devastador sobre el crecimiento y el rendimiento de los cultivos. La mayoría de los suelos salinos se encuentran en zonas áridas y semiáridas, se han formado de manera natural mediante la intemperización de las rocas que liberan sales solubles y éstas se acumulan a través del tiempo (Pichu, 2002). Aunado a esto, el empleo de sistemas de riego en los cultivos y el uso indiscriminado de fertilizantes aumentan gradualmente la concentración de estas sales, con afectaciones de hasta un 20% de los terrenos agrícolas (FAO, 2013). La salinidad daña las propiedades fisicoquímicas del suelo y afecta los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas, reduce el porcentaje de germinación, peso fresco y seco de brotes, contenido de clorofila, fotosíntesis, respiración y síntesis de proteínas (Rasool *et al.*, 2013; Alqarawi *et al.*, 2014) lo que conlleva a una reducción del potencial productivo de la mayoría de los cultivos de importancia económica. Uno de ellos, es el chile (*Capsicum* spp.), este género se considera como sensible o moderadamente sensible al estrés salino a lo largo de toda su ontogenia (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014). En los últimos años, se ha implementado el uso de microorganismos benéficos en los cultivos, los cuales mejoran la tolerancia al estrés biótico y abiótico. Tal es el caso de *Trichoderma* spp., utilizados como agentes de control biológico y como biofertilizante en plantas, ya que tienen la capacidad de producir diferentes compuestos bioactivos y elicitores que interactúan con las raíces lo que aumenta directamente el potencial de crecimiento y la tolerancia al estrés abiótico. Es importante estudiar las interacciones entre planta-microorganismo en condiciones de estrés abiótico. De ahí la importancia de estimar si la presencia de *T. asperellum* puede mejorar los mecanismos de tolerancia a la salinidad en el género *Capsicum*. Además, el crecimiento de plantas cultivadas tolerantes a las tensiones ambientales se considera un enfoque prometedor, que puede ayudar a satisfacer las crecientes demandas de alimentos, de ahí la importancia de utilizar especies silvestres o criollas.

# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### 1.1 Estrés por salinidad en la agricultura

El suelo agrícola está disminuyendo gradualmente y las razones principales son el uso intensivo de prácticas agrícolas, la urbanización, el estrés biótico y abiótico. Particularmente, el estrés por salinidad disminuye la productividad de los cultivos agrícolas, y en consecuencia su rendimiento (Ahmad *et al.*, 2015; Xu, 2016). Prácticas agronómicas como el riego con aguas duras, la aplicación de fertilizantes inadecuados o en exceso (Kumar *et al.*, 2017a), y los residuos industriales han favorecido la salinización de los suelos, especialmente en zonas áridas. A nivel mundial, al menos el 74% de los suelos dedicados a la agricultura muestra algún problema de salinidad (Orosco-Alcalá *et al.*, 2018). Las tierras de regadío cubren más de 310 millones de hectáreas, de las cuales el 20% están afectadas por salinidad (62 millones de hectáreas) (FAO, 2013). En México, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, señala que se encuentran alrededor de 100 millones de ha de suelos con problemas de salinidad y sodicidad, y 30% del área irrigada presentan problemas con un nivel medio o alto de sales en el suelo (SEMARNAT, 2009; Orosco-Alcalá *et al.*, 2018); de manera particular al norte y noroeste del país; en los estados de Sonora, Sinaloa y Tamaulipas. En Chiapas se reporta una superficie afectada de 25.22 miles de hectáreas (SEMARNAT, 2003).

### 1.2 Efecto del estrés salino en las plantas

Cuando una planta está sujeta a condiciones extremas se dice que se encuentra en estrés, como resultado las plantas pueden presentar cambios fisiológicos, anatómicos, bioquímicos y moleculares, varía según las condiciones de crecimiento de la planta, la duración de la exposición, la cantidad o intensidad del factor, así como del tipo de estrés a la cual esté expuesta

(Pilon-Smits *et al.*, 2009; HanumanthaRao *et al.*, 2016). Inicialmente, la salinidad del suelo limita el crecimiento de las plantas a través del estrés osmótico, que luego es seguido por la toxicidad iónica y en última instancia el estrés oxidativo (Kamran *et al.*, 2020; Srivastava & Srivastava, 2020) (Figura 1). Diversos estudios revelaron que la biomasa vegetal (biomasa fresca y seca), el número de hojas y el área foliar se vieron afectadas por los niveles de salinidad de hasta 8 dSm<sup>-1</sup> (Mallahi *et al.*, 2018; Hajiboland *et al.*, 2014; Ahmadi *et al.*, 2018). A nivel fisiológico, algunos síntomas de daño en la planta, son la necrosis y la quemadura de la punta de la hoja debido a iones de Na<sup>+</sup> o Cl<sup>-</sup>. Se ha reportado que el estrés salino afecta negativamente la germinación de las semillas, el crecimiento de las plantas, el contenido de agua de las hojas, la absorción de nutrientes, el rendimiento y la productividad de los cultivos (Kim *et al.* 2014; He *et al.*, 2018). Ahora bien, el grado en que la salinidad afecta a una planta difiere mucho en las especies y en las variedades (Ghoulam *et al.*, 2002).



**Figura 1. Resumen esquemático del estrés salino en plantas y las correspondientes respuestas fisiológicas intrínsecas (Adaptado de HanumanthaRao *et al.*, 2016).**



### 1.2.1 Estrés osmótico

El estrés osmótico es el primer estrés experimentado cuando una planta está expuesta al suelo salino (Horie *et al.*, 2011), ocurre cuando la acumulación de sales en la zona radical y en tejidos de la planta causa que el potencial hídrico del suelo disminuya con el aumento de la concentración de sales, si este es mucho más bajo en comparación con el potencial hídrico de la planta (Munns & Tester, 2008). Debido al bajo potencial osmótico las plantas expuestas a salinidad no pueden tomar agua adecuada para los procesos metabólicos o mantener la turgencia. Este efecto disminuye el crecimiento de hojas y raíces, incluso cuando las concentraciones de iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) en las células están por debajo de las concentraciones tóxicas. Además, el efecto osmótico puede inhibir la conductancia estomática, la fotosíntesis, la actividad de las enzimas antioxidantes, la absorción de nutrientes y el crecimiento de hongos micorrícicos (Pang *et al.*, 2010; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2012; HanumanthaRao *et al.*, 2016).

### 1.2.2 Estrés iónico

Uno de los efectos más perjudiciales es la acumulación de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en las células vegetales, ya que ocasionan toxicidad iónica, es decir, el efecto de la sustitución de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  por  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en diferentes reacciones bioquímicas debido a una mayor concentración de sal en la zona de la raíz (Kamran *et al.*, 2019). Esto ocurre más tarde cuando los niveles de sal alcanzan un umbral, más allá del cual la planta no puede mantener la homeostasis y el crecimiento iónico (Liang *et al.*, 2018). Las altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  inhiben directamente los sistemas de transporte de  $\text{K}^+$  debido a la similitud química de ambos iones (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2012), el  $\text{Na}^+$  provoca la despolarización del potencial eléctrico de la membrana, lo que disminuye la absorción e induce el flujo de salida del  $\text{K}^+$  (Hasegawa, 2013; Dekoum *et al.*, 2017). La acumulación de  $\text{Na}^+$  principalmente en las hojas, disminuye la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , una baja concentración citosólica de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  inhibe la actividad enzimática y la síntesis de proteínas (Machado & Serralheiro, 2017). Asimismo, la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las hojas más viejas induce su senescencia prematura (James *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2014).

### 1.2.3 Estrés oxidativo

La toxicidad iónica y el estrés osmótico son tensiones primarias que pueden causar estrés oxidativo y una serie de tensiones secundarias (Liang *et al.*, 2018). El estrés oxidativo es consecuencia de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo (OH.) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2012). En circunstancias estresantes (bióticas y abióticas), un incremento en la producción de ROS es un indicador de estrés a nivel celular (Baxter *et al.*, 2013), se conoce como un mensajero secundario que desempeña su papel en las actividades biológicas de las plantas, que van desde la expresión y translocación génica hasta la química enzimática (Miller *et al.*, 2010; Kamran *et al.*, 2019); así mismo, las ROS son usualmente generadas por las actividades normales de la célula (Zepeda-Jazo *et al.*, 2011; Bhattacharjee, 2012). Sin embargo, en plantas, los daños por ROS causan inhibición de la actividad enzimática y la síntesis de proteínas, peroxidación de lípidos, así como daño a las estructuras de ácidos nucleídos y membranas (Farhouni *et al.*, 2011). En raíces, las ROS inducen el flujo de salida de  $K^+$ , se ha relacionado a las ROS y la deficiencia de  $K^+$  como causantes de muerte celular programada (PCD) y necrosis en las células (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2012; Shabala y Pottosin, 2014).

### 1.3 Estrategias de tolerancia al estrés salino en plantas

La tolerancia es la capacidad de las plantas para adaptarse o resistir a la salinidad de acuerdo con Taiz y Zeiger (2010), en las plantas existen dos mecanismos generales para resistir a las sales; la evasión y la tolerancia. La primera consiste en evitar la acumulación de sales y la segunda consiste en la aptitud en no perder su capacidad productiva a un nivel de salinidad determinado. Esta adaptación o la tolerancia al estrés de salinidad implican rasgos fisiológicos complejos, vías metabólicas y redes moleculares o genéticas. (Palao *et al.*, 2014). A pesar de su abundancia, el sodio ( $Na^+$ ) no es un elemento esencial para la mayoría de las plantas y llega a ser extremadamente tóxico en altas concentraciones, principalmente en la parte aérea. Por tal

motivo, es necesario mantener un eficiente control de su transporte y distribución en células y tejidos. (Horie *et al.*, 2012; Adams & Shin, 2014). Algunos de los mecanismos para evitar la salinidad (Figura 2) incluyen la germinación o madurez retrasadas hasta que prevalezcan condiciones favorables; la exclusión de  $\text{Na}^+$  en la zona de la raíz o el crecimiento preferencial de la raíz en áreas no salinas; la compartimentalización en vacuolas y su extrusión al medio externo o almacenamiento en hojas más viejas, así como la acumulación de solutos compatibles para la osmoregulación (Yadav *et al.*, 2011; Adolf *et al.*, 2013; Deinlein *et al.*, 2014; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014).

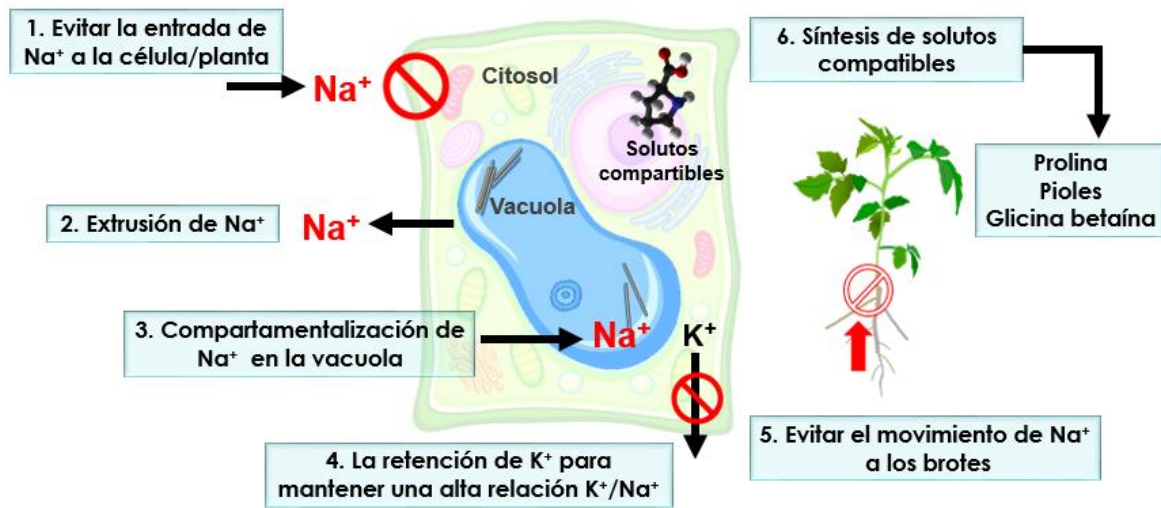


Figura 2. Estrategias de tolerancia al estrés salino en las plantas. Fuente: Bojórquez- Quintal, 2012.

### 1.3.1 Entrada y salida de Na<sup>+</sup> en la célula

La entrada pasiva de Na<sup>+</sup> a la raíz depende del gradiente de concentración y la diferencia de potencial a través de la membrana plasmática (Apse & Blumwald, 2007). Las células epidérmicas constituyen la primera barrera para el movimiento de iones en la raíz. Esta barrera permite a la mayoría de las plantas excluir alrededor del 98% de las sales en la solución del suelo, lo que permite que sólo el 2% de las sales entren al xilema (Munns *et al.*, 2005; Plett y Moller, 2010). El flujo de entrada de Na<sup>+</sup> está mediado por canales catiónicos no selectivos (NSCC), transportadores de K<sup>+</sup> de alta afinidad (HKTs) y transportadores de cationes de baja afinidad (LCT) en las células epidérmicas de la raíz (Apse & Blumwald, 2007; Plett & Moller, 2010; Maathuis, 2014). Posteriormente, el Na<sup>+</sup> es transportado radialmente hacia el xilema de la raíz por la vía del apoplasto y el simplasto. Después de ser cargado en el xilema, es finalmente transportado hacia los brotes por la corriente de transpiración y flujo del xilema (Adams & Shin, 2014). Otros candidatos que se sugieren para mediar la toma o flujo de entrada de Na<sup>+</sup> son los transportadores de K<sup>+</sup> de alta afinidad (KUP/HAK/KT), los canales permeables a K<sup>+</sup> (AKT1) y los cotransportadores cloro-cación (CCC) (Plett & Moller, 2010; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2012).

La salida o extrusión de Na<sup>+</sup> del citosol al medio externo es una de las estrategias sofisticadas que emplean las plantas para evitar el exceso de este catión en el citosol. Ambos procesos se llevan a cabo por transportadores de la familia CPA1 (Cación/protón antiporter 1, por sus siglas en inglés); involucrados en la homeostasis de cationes y pH al intercambiar Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> por H<sup>+</sup> (Chanroj *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2013; Pires *et al.*, 2013). En *Arabidopsis*, los intercambiadores CPA1 se dividen en dos grupos o familias: los intercambiadores NHX y SOS1. Las familias NHX y SOS1 tienen una historia evolutiva diferente y se sugiere que esta diferencia está relacionada con su función y localización celular (Pires *et al.*, 2013). Los intercambiadores SOS1 están localizados en la membrana plasmática y son responsables del flujo de salida de Na<sup>+</sup> de la célula (Shi *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2003). La actividad de la H<sup>+</sup> ATPasa también es esencial para el funcionamiento de los intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de la membrana plasmática (SOS1), ya que genera la fuerza motriz (H<sup>+</sup>) para que se

lleve a cabo el flujo de salida de  $\text{Na}^+$  del citosol al apoplasto. Una mayor actividad de la  $\text{H}^+$ -ATPasa o flujo de salida de protones mantiene un potencial de membrana negativo durante estrés salino. Un potencial de membrana negativo reduce la fuga de  $\text{K}^+$  y facilita la absorción de  $\text{K}^+$ , lo que permite a las plantas retener  $\text{K}^+$  en el citosol (Chen *et al.*, 2007b; Bose *et al.*, 2013, 2014). Hay que tener en cuenta que una mayor actividad de la bomba de  $\text{H}^+$  es un evento energéticamente costoso por la cantidad de ATP que se consume (Malagoli *et al.*, 2008); por lo tanto, no puede considerarse como un mecanismo de tolerancia permanente, siendo tal vez una solución para contender temporalmente al estrés por sal (Bose *et al.*, 2013; 2014).

### **1.3.3 Compartimentalización de $\text{Na}^+$ en la vacuola**

Tanto las glicófitas como las halófitas no pueden tolerar grandes cantidades de sal en el citoplasma y, por lo tanto, en condiciones salinas, restringen el exceso de sales en la vacuola o compartimentan los iones en diferentes tejidos para facilitar sus funciones metabólicas (Iyengar & Reddy, 1996; Zhu, 2003). En general, los mecanismos de exclusión son efectivos a niveles de salinidad bajos a moderados, mientras que la acumulación de iones es el mecanismo principal utilizado por los halófitos a altos niveles de sal, presumiblemente junto con la capacidad de compartimentar iones en la vacuola (Jeschke, 1984). Los glucófitos limitan la absorción de  $\text{Na}^+$ , o la partición de sodio en los tejidos más viejos, como las hojas, que sirven como compartimentos de almacenamiento (Cheeseman, 1988). Apse *et al.* (1999) mencionaron que la eliminación de Na del citoplasma o la compartimentación en las vacuolas se realiza mediante un antiportador de enzima  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  inducible por la sal. La inclusión de iones en el citoplasma puede conducir a un ajuste osmótico que generalmente se acepta como una adaptación importante a la salinidad (Guerrier, 1996). La disminución del potencial osmótico de la hoja compensaría la disminución del potencial hídrico inducida por la sal, lo que ayuda a mantener la presión de turgencia y las funciones celulares en condiciones adversas de agua. Bajo estrés salino, la remolacha azucarera acumuló más iones inorgánicos en las hojas (Ghoulam *et al.*, 2002). Esta acumulación de iones de sal podría desempeñar un papel importante en el ajuste osmótico en plantas estresadas si se compartimentan eficientemente. La capacidad de regular la

concentración de sal a través de la compartimentación es un aspecto importante para la tolerancia a la sal.

#### **1.3.4 Mantener una alta relación $K^+/Na^+$**

Bajo estrés de salinidad, es crucial que las células vegetales mantengan un nivel bajo de  $Na^+$  citosólico mientras mantienen el alto nivel de  $K^+$ , lo que resulta en una alta relación citosólica de  $K^+/Na^+$  que es preferible para los metabolismos celulares vitales (Jeschke, 1984; Blumwald, 2000). Se ha demostrado que la sensibilidad de las enzimas citosólicas de los glucófitos y halófitos al aumento de los niveles de sal es comparable, lo que sugiere que mantener una alta proporción de  $K^+/Na^+$  citosólico es un requisito básico para las células vegetales bajo estrés de salinidad, independientemente de la diferencia innata en la sensibilidad a la sal (Glenn *et al.*, 1999; Horie *et al.*, 2012). Esta relación disminuye como consecuencia del incremento en el contenido de  $Na^+$  y la reducción del contenido de  $K^+$  por la fuga inducida por  $Na^+$ . Por lo tanto, la extrusión o flujo de salida de  $Na^+$  y la retención de  $K^+$  son mecanismos importantes para el mantenimiento de la relación  $K^+/Na^+$  bajo condiciones de salinidad (Zhang & Shi, 2013). Los genotipos tolerantes mantienen mayor relación  $K^+/Na^+$  que los sensibles (Volkov *et al.*, 2006; Aktas *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). La relación  $Na^+/K^+$  es el inverso de la relación  $K^+/Na^+$ , y ésta es mayor en los genotipos sensibles. Por lo general, las eudicotiledóneas son más tolerantes a la sal que las monocotiledóneas (Maas & Hoffman, 1977; Munns & Tester, 2008). Además, presentan diferentes patrones de distribución de  $Na^+$  y  $K^+$  en órganos y tejidos, lo que influye de forma significativa en su tolerancia a la salinidad (Conn & Gilliam, 2010).

#### **1.3.5 Traslocación de $Na^+$**

Muchas glicófitas (plantas con baja tolerancia a la sal) son clasificadas como excluidoras de sales, previenen la acumulación de sales en los tejidos fotosintéticos a través del control del

transporte de  $\text{Na}^+$  en el xilema de la raíz (Maathuis *et al.*, 2014). En las plantas, los iones y el agua llegan al xilema de la raíz por la vía simplástica y la apoplástica. Esta última permite el movimiento de iones hacia el xilema a través de la pared celular y espacios intercelulares sin atravesar la membrana plasmática (flujo bypass). El transporte de  $\text{Na}^+$  por la vía apoplástica está limitado por la banda de Caspari y las capas de suberina en la exodermis y la endodermis de la raíz. Se especula que las raíces jóvenes, los sitios de inicio de las raíces laterales y el ápice de la raíz, carecen de estas capas, lo que permite la entrada de  $\text{Na}^+$  al xilema. Sin embargo, no hay evidencia de este proceso (Horie *et al.*, 2012; Maathuis *et al.*, 2014). Por otro lado, el transporte de  $\text{Na}^+$  hacia el xilema por la vía simplástica involucra proteínas integrales de membranas como los transportadores HKT (Plant High-Affinity Potassium, por sus siglas en inglés). Los transportadores HKTs participan en el movimiento de  $\text{Na}^+$  a través de toda la planta. Éstos se dividen en dos subfamilias, HKT1 y HKT2, dependiendo de su selectividad a  $\text{Na}^+$  (HKT1) o a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (HKT2). La selectividad depende de la presencia de un residuo de serina (HKT1) y glicina (HKT2) en el primer poro de la proteína (Platten *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2013). En *Arabidopsis*, el HKT1 está localizado en la membrana plasmática de células del parénquima del xilema y es responsable de la descarga del  $\text{Na}^+$  del xilema (Sunarpi *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007). También, se ha sugerido que el AtHKT1 participa en la carga de  $\text{Na}^+$  en el floema y en la recirculación de  $\text{Na}^+$  hacia las raíces (Berthomieu *et al.*, 2003). La recuperación de  $\text{Na}^+$  del xilema y la recirculación de  $\text{Na}^+$  de los brotes hacia las raíces para evitar su sobreacumulación son mecanismos de tolerancia a salinidad en glicófitas. Ambos mecanismos son mediados por los transportadores HKT1, tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas (Almeida *et al.*, 2013; Adams & Shin, 2014).

### **1.3.6. Síntesis de solutos compatibles**

La presencia de sales en los medios de crecimiento usualmente da como resultado la acumulación de compuestos de bajo peso molecular, denominados solutos compatibles, los cuales no interfieren con reacciones bioquímicas normales (Zhifang & Loescher, 2003, Yadav *et al.*, 2011). Estos solutos compatibles incluyen principalmente prolina, glicina-betaína,

sacarosa, trehalosa, las poliaminas y alcoholes de azúcar, los cuales se sintetizan con el fin de evitar la pérdida de agua y mantener la turgencia celular (Hayat *et al.*, 2012; Deinlein *et al.*, 2014). Se ha informado que los niveles de prolina aumentan significativamente en las hojas de variedades de *Capsicum chinense* después de siete días de estrés salino (150 mM de NaCl) (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014), esto también se observó en plántulas de *S. Lycopersicum* var. Rio Grande tratadas con 200 mM de NaCl (Chaman *et al.*, 2014; Ghias Ali & Rab, 2017) y en una variedad tolerante de caña de azúcar (Vasanth & Rajlakshmi, 2009); este aumento se correlacionó positivamente con el nivel de tolerancia a la sal. Las funciones propuestas de estos compuestos en condiciones de estrés incluyen el ajuste osmótico, la protección de macromoléculas celulares, el almacenamiento de nitrógeno, el mantenimiento del pH celular, la desintoxicación de las células y la eliminación de radicales libres. (Parida *et al.*, 2002).

#### **1.4 Uso de microorganismos para la tolerancia al estrés abiótico**

La necesidad de mejorar la calidad y productividad agrícola ha traído consigo el uso excesivo de fertilizantes químicos, creando una grave contaminación ambiental. Para reducir los efectos causados por estrés biótico y abiótico en la productividad de los cultivos, es necesario emplear herramientas y mecanismos tolerantes a este factor. Una posibilidad de minimizar los impactos negativos consiste en combinar tecnología orgánica con microorganismos para el crecimiento sinérgico de las plantas y la biorremediación de suelos contaminados resultantes de la agricultura intensiva (Baez-Rogelio *et al.*, 2017). El uso de biofertilizantes y biopesticidas es una alternativa para mantener una producción con bajo impacto ecológico (Hermosa *et al.*, 2012). Diferentes bacterias y hongos con origen en el suelo pueden colonizar la rizosfera y pueden tener efectos benéficos sobre la planta. Además de los hongos micorrícicos clásicos y las bacterias *Rhizobium*, otras rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPR) y hongos como *Trichoderma* spp. y *Piriformospora indica* pueden estimular el crecimiento de las plantas al suprimir las enfermedades que las afectan (Van Wees *et al.*, 2008) y la estimular las defensas de las plantas contra el daño biótico y abiótico (Shoresh *et al.*, 2010).



### 1.5 *Trichoderma* spp. como estrategia contra el estrés salino

Algunas especies del género *Trichoderma* se consideran simbioses endofíticas de plantas multifuncionales debido a su capacidad de colonizar espacios de raíces intercelulares y sus múltiples efectos benéficos en las plantas (Shoresh *et al.*, 2010; Harman, 2011). Como resultado de la asociación simbiótica, se puede inducir resistencia al estrés biótico, abiótico (Hermosa *et al.*, 2012; Fu *et al.* 2017) y fisiológico, así como la promoción del crecimiento de las plantas (Mastouri *et al.*, 2010; Shoresh *et al.*, 2010). Se ha reportado que algunos tratamientos con *Trichoderma* spp. alivian el estrés por NaCl; aumentan significativamente la longitud y el peso fresco del brote y de la raíz, así como el número y área de las hojas y el contenido de clorofila en cultivos como el garbanzo (240 mM) (Rawat *et al.*, 2013), mostaza india (200 mM) (Ahmad *et al.*, 2015), pepino (4.4 g NaCl kg<sup>-1</sup>) (Qi & Zhao, 2013), maíz (10% NaCl) (Kumar *et al.*, 2017b) y trigo (50 mg ml<sup>-1</sup>) (Zhang *et al.*, 2019). El efecto positivo depende en gran medida del genotipo fúngico y vegetal (Harman *et al.*, 2004b; Tucci *et al.*, 2011) y el estado fisiológico de la planta (Donoso *et al.*, 2008). Los efectos benéficos de *Trichoderma* sobre el estrés abiótico han sido bien documentados (Donoso *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2009; Qi & Zhao, 2013; Kumar *et al.*, 2017b; Zhang *et al.*, 2019), aunque los mecanismos que controlan los factores de estrés de múltiples plantas aún se desconocen (Hermosa *et al.*, 2012). Algunos mecanismos por medio del cual se ejerce el efecto benéfico en el alivio del estrés se encuentran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Funciones ecológicas de *Trichoderma* spp. en la interacción con las plantas.**

<b>MODO</b>	<b>MECANISMO</b>	<b>EJEMPLO</b>
Solubilización de nutrientes	Secuestro de hierro	Producción de Sideróforos, Procesos de oxidación, solubilización, quelatación y reducción (Loper & Buyer, 1999; Qi & Zhao, 2013).
Señalización a través de COVs	Antibiosis	Metabolitos secundarios volátiles y no volátiles como alquilpironas, isonitrilos, policétidos, peptaibols, dicetopiperazinas, sesquiterpenos y esteroides (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998; Mukherjee <i>et al.</i> , 2013).
Favorecimiento de la planta	Producción de reguladores de crecimiento	El etileno (ET), el ácido jasmónico (AJ), el ácido salicílico (AS), Ácido indol acético (IAA), auxinas y giberelina (GA3) (Martínez-Medina <i>et al.</i> , 2010; Avni <i>et al.</i> , 1994; Martinez <i>et al.</i> , 2001; Contreras-Cornejo <i>et al.</i> , 2009; Sofo <i>et al.</i> , 2011).
Inducción de defensa vegetal	Activación de resistencia local o sistémica	Las proteínas quininas activadas por mitógeno (MAP) involucradas en la señalización de defensa de la planta (Koornneef & Pieterse, 2008; Shores <i>et al.</i> , 2006).
Adaptación al estrés salino	Producción de enzimas hidrolíticas	Enzimas que funcionan como eliminadores de ROS: superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa (Mastouri, Bjorkman & Harman, 2012). Expresión del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACCD) (Brotman <i>et al.</i> , 2013; Zhang <i>et al.</i> 2016b).
	Acumulación de solutos compatibles	Acumulación de osmoreguladores como L-prolina (Bojórquez-Quintal <i>et al.</i> , 2014).

### 1.6 Importancia agrícola de *Trichoderma* spp.

Las especies de *Trichoderma* predominan en ecosistemas terrestres (bosques o suelos agrícolas), tienen bajo requerimiento nutrimental pero relativamente amplio rango de temperatura (25-30°C) para su crecimiento (Sandle, 2014). Poseen alta adaptabilidad a condiciones ecológicas y pueden crecer de manera saprofítica, interactúan con animales y plantas (Zeilinger *et al.*, 2016), se desarrollan en diversos sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura (Ramos *et al.*, 2008). Los efectos que promueven el

crecimiento de *Trichoderma* en las plantas incluyen una mayor germinación de semillas, una mayor biomasa de hojas y raíces, y una mejor absorción de nutrientes (Viterbo *et al.*, 2010). También se ha demostrado que *Trichoderma* activa la expresión de genes asociados con la fotosíntesis, lo que mejora la capacidad fotosintética bajo amenaza de fitopatógenos (Shoresh *et al.*, 2010). Hay varios agentes de biocontrol eficientes dentro del género, que incluyen *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. roseum*, *T. koningii* y *T. gamsii* (Zehra *et al.*, 2017). Estas cepas se han registrado comercialmente para su uso en la protección de las plantas (Hermosa *et al.*, 2012). El estudio de la diversidad de especies de *Trichoderma* en diversos hábitats naturales, ha permitido ampliar el conocimiento sobre su aporte biotecnológico, y su importancia ecológica y agrícola (Jaklitsch & Voglmayr, 2015; Torres-De la Cruz *et al.*, 2015).

### **1.7 El género *Capsicum* spp.**

Las especies de *Capsicum* son originarias de Centro y Sudamérica. Es la tercera solanácea de mayor cultivo en el mundo, después del tomate y la papa. (Pozo & Ramírez, 2003; Solís-Marroquín, 2017). La importancia de este cultivo se debe a su capacidad de adaptación a diferentes regiones agroclimáticas y a su amplia variedad de formas, tamaños, colores y grado de pungencia de sus frutos (Qin *et al.*, 2014). Dichas especies se han clasificado con base a sus características fenotípicas como la morfología de la flor y del fruto. Dentro de este género cinco especies han sido domésticas: *C. annum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens* y *C. chinense* (Milla, 2006).

**Cuadro 2. Clasificación taxonómica del género *Capsicum*.**

<b>CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA</b>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Asteridae
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Género</b>	<i>Capsicum</i> L. pepper
<b>Especie</b>	<i>C. annuum</i> L. – cayenne pepper
<b>Especie</b>	<i>C. chinense</i> Jacq. – aji
<b>Especie</b>	<i>C. pubescens</i> Ruiz & Pavon – rocoto
<b>Variedad</b>	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> L. – cayenne pepper
<b>Variedad</b>	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> (Dunal) Heiser & Pickersgill - chilipiquin
<b>Variedad</b>	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i> L. – cayenne pepper
<b>Variedad</b>	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> (Willd.) Eshb. - aji

Fuente: Adaptación de la base de datos del Sistema Integrado de Información Taxonómica de la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN) en línea del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (GRIN, 2014).

En México, la producción anual es de 3.2 millones de toneladas con un crecimiento anual promedio de 4.82% en el periodo 2003-2016. En el 2016, se exportaron 982.48 millones de toneladas a EEUU (SIAP, 2017). Es considerado uno de los condimentos principales de la comida mexicana, su consumo y cultivo ha incrementado debido a las propiedades que presenta: vitaminas (A, C y B<sub>6</sub>, principalmente), antioxidantes,  $\beta$ -caroteno, flavonoides, anticancerígenos, antimicrobianos, pigmentos, saborizantes, aceites fijos y volátiles, carotenoides, oleoresinas y alcaloides con potencial insecticida (Liu *et al.* 2013), además de los usos en la industria farmacéutica y militar por el contenido de capsaicina (Solís-Marroquín, 2017). Sin embargo, este género es sensible a varios tipos de estrés biótico (plagas y enfermedades) y a factores abióticos (sequía y salinidad). Comparado con otros cultivos hortícolas, las plantas de chile se

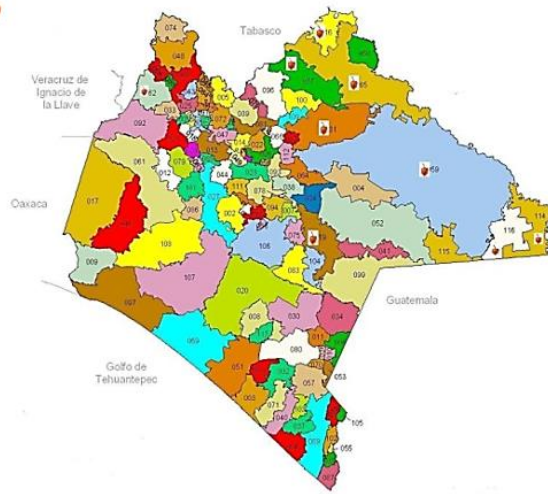
consideran moderadamente sensibles, sensibles o altamente susceptibles al estrés salino (Aktas *et al.*, 2006; Subramanyam *et al.*, 2011; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014). Se ha reportado que el rango de concentración de NaCl en el que se ve afectado el crecimiento de los chiles varía entre 0-100 mM. Este grado de toxicidad depende de la especie, del cultivar y de las condiciones de crecimiento (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2012). Dado que diferentes células, tejidos y órganos están adaptados para realizar funciones específicas y a menudo diversas, la duración y el impacto del estrés salino en diferentes partes de la planta pueden diferir en severidad durante las primeras etapas de crecimiento (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2016).

### **1.7.1 El género *Capsicum* spp. en Chiapas**

El estado de Chiapas es rico en variedades endémicas y silvestres de chiles, el Comité Nacional Sistema Producto Chile A.C. registra la producción de chile (*Capsicum annum* L.), en la Región Norte del estado de Chiapas principalmente en quince Municipios: Palenque, Catazajá, Salto de Agua, Benemérito de las Américas, Marqués de Comillas, La Libertad, (DDR VI Selva Palenque) Pichucalco y Ostuacan, (DDR V Norte Pichucalco) Comitán, Venustiano Carranza y la Trinitaria (DDR III Fronteriza) Ocosingo y Chilón (DDR X Selva Ocosingo) Berriozábal y Cintalapa (DDR I Centro) (Figura 3). Sin embargo, el monocultivo ha afectado a las variedades endémicas de esta región, lo que a largo plazo puede provocar la pérdida de estas variedades.

**Municipios con producción de chile**

1. Palenque
2. Catazajá
3. Salto de Agua
4. Benemérito de las Américas
5. Marqués de Comillas
6. Chilón
7. Ostucán
8. Comitán
9. Ocosingo
10. Pichucalco
11. La libertad
12. Berriozábal
13. Cintalapa
14. Venustiano Carranza
15. La Trinitaria



**Figura 3. Municipios productores de chile en Chiapas. Fuente: Elaboración con Datos del Comité Nacional Sistema Producto Chile A.C. (CONAPROCH, 2010).**

## OBJETIVOS

### 1.2.1. GENERAL

Evaluar el efecto de *Trichoderma asperellum* sobre la tolerancia de plántulas de *Capsicum* spp. expuestas a estrés salino por cloruro de sodio.

### 1.2.2. ESPECÍFICOS

Establecer el rango de tolerancia a salinidad (NaCl) de *Trichoderma asperellum* y sus efectos sobre el crecimiento micelial y esporulación.

Determinar el efecto de NaCl sobre el crecimiento del sistema radicular en plántulas de chile (*Capsicum* spp.) en un modelo *in vitro*.

Determinar el efecto de *Trichoderma asperellum* sobre las variables de crecimiento de plantas de chile (*Capsicum* spp.) bajo estrés salino en un modelo *in vivo*.

## JUSTIFICACIÓN

El estrés salino afecta negativamente el crecimiento de las plantas, el rendimiento y la productividad de los cultivos (Kim *et al.*, 2014). A nivel mundial, al menos 800 millones de hectáreas de tierra en el mundo son afectadas por la sal, y el 20% de estas son de regadío (Ali *et al.*, 2017). Aunado a lo anterior, la desertificación y el cambio climático exacerbaban los problemas en la producción de alimentos, sobre todo en países en desarrollo, ya que merman el rendimiento y la calidad de los cultivos (Zhang, 2016a). Así que, para garantizar la seguridad alimentaria, es necesario incrementar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico y reducir las pérdidas de producción de los cultivos. Una de las estrategias implementadas en los últimos años, ha sido el uso de microorganismos benéficos, tal es el caso de *Trichoderma* spp. el cual tiene la capacidad de producir compuestos bioactivos y elicitores que interactúan con las raíces de la planta hospedante, lo que aumenta el potencial de crecimiento de la planta y la tolerancia al estrés abiótico. El estado de Chiapas es rico en variedades endémicas y silvestres de chiles, entre las que destacan *C. annumm* y *C. pubescens*, sin embargo, se ha reportado que el cultivo de *Capsicum* es considerado como moderadamente sensible o sensibles a la salinidad (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014). Hay evidencias que indican que las plantas silvestres tienen mecanismos de defensa para tolerar el estrés, ya que están expuestas a las condiciones adversas del ambiente. Esta cualidad y la interacción con microorganismos simbioses brindan la oportunidad de identificar nuevas estrategias para sobrevivir ante diferentes condiciones adversas. Así mismo, se contribuye a mantener la diversidad de las variedades nativas ya que hoy en día, presentan erosión genética como consecuencia de la destrucción de sus áreas naturales o por sustitución de variedades mejoradas, y se manifiesta en la pérdida de genes de interés agronómico y comercial (Alonso *et al.*, 2012). El conocimiento generado, se impulsa prácticas sustentables en las actividades agrícolas y ayuda a preservar los recursos genéticos de los chiles nativos.



## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

Para cumplir con el objetivo del presente estudio, primero se evaluó el potencial de la cepa fúngica para tolerar la salinidad, después los efectos que el NaCl provocan en las plántulas de *Capsicum* spp. y finalmente, comprobar si *T. asperellum* ayuda a mitigar el estrés salino.

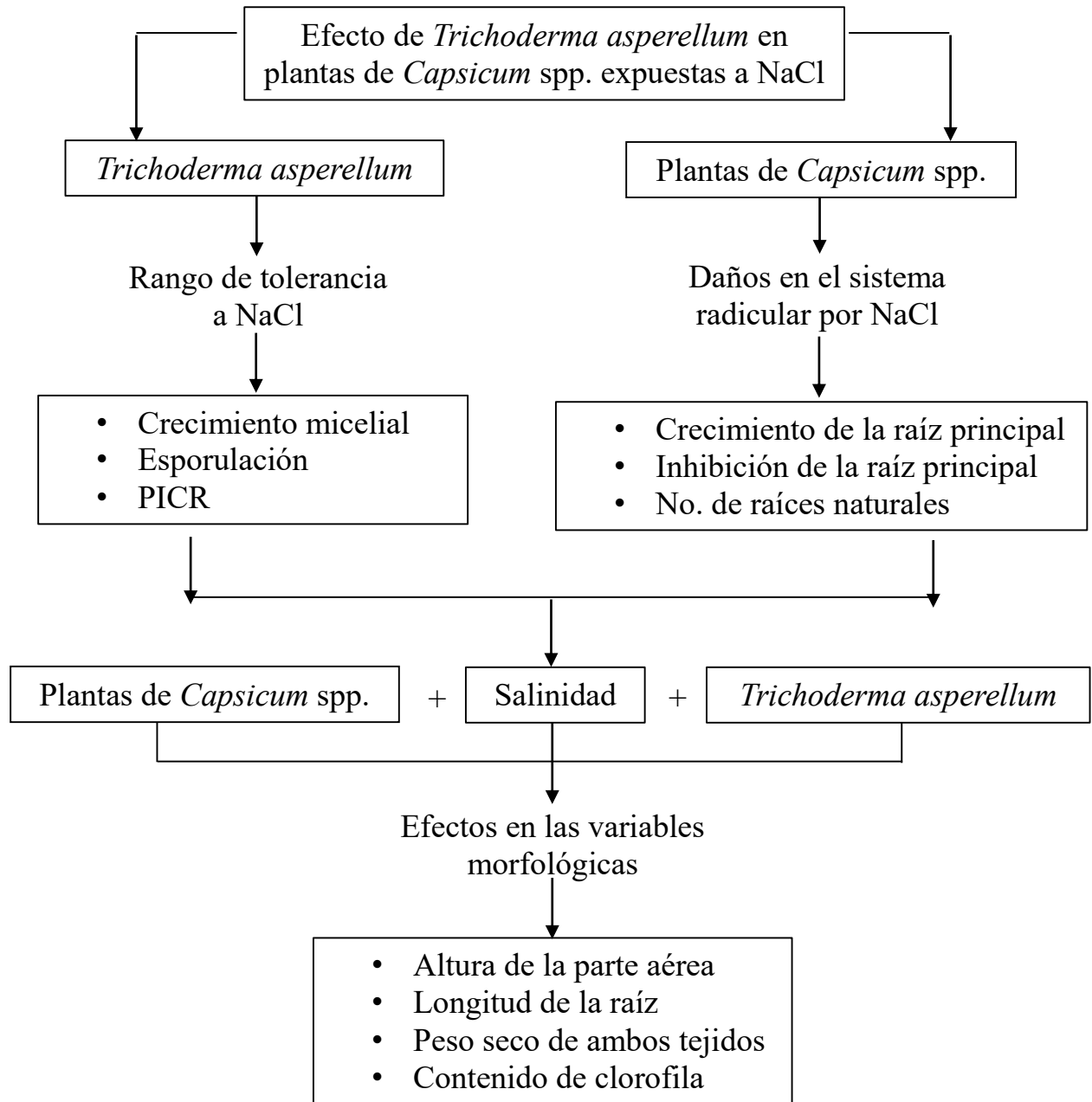


Figura 4. Estrategia experimental general

## CAPÍTULO II

### **Establecimiento del rango de tolerancia a NaCl de *Trichoderma asperellum* y sus efectos sobre el crecimiento micelial y esporulación.**

#### **2.1 INTRODUCCIÓN**

*Trichoderma asperellum* es un hongo filamentoso (Ascomycota: Hypocreales), saprofito, de crecimiento rápido, se presenta naturalmente en diferentes hábitats y tiene la capacidad de producir grandes cantidades de conidios con una larga vida útil (Mohamed & Haggag, 2006; Martínez *et al.*, 2015). Las colonias de los aislamientos de *Trichoderma* poseen color blanco y se tornan verde oscuro con abundante esporulación (Rifai, 1969). En general, en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) este hongo no presenta micelio aéreo y su pigmentación puede variar desde verde oscuro hasta verde claro y, en ocasiones, tornarse amarillento. Algunos aislamientos tienen olor típico a coco (Samuels, 1996). A nivel mundial, las especies de *Trichoderma* son reconocidas agentes de control biológico, debido a su modo de acción, algunas cepas de *Trichoderma* participan en la tolerancia de las plantas frente a diferentes tipos de estrés abiótico, como sequía, altas temperaturas y salinidad (Mastouri *et al.*, 2010; Yasmeeen & Siddiqui, 2017). Los intentos de reducir la salinidad del suelo con métodos mecánicos como el riego, el drenaje y la recuperación de los suelos no siempre son prácticos o económicos (Rawat *et al.*, 2013). Por lo tanto, es fundamental conocer los efectos adversos de la salinidad en microorganismos benéficos y contar con cepas de *Trichoderma* tolerantes al estrés salino, para mejorar el crecimiento de las plantas bajo estas condiciones. En este estudio, se estimó el impacto de la salinidad por NaCl en el crecimiento micelial y esporulación *in vitro* de la cepa Ta 13-17 de *Trichoderma asperellum*, ya que es el primer paso para su aplicación en suelos salinos.

## 2.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para establecer el rango de tolerancia a la salinidad (NaCl) de la cepa de *T. asperellum*, se cultivó en cajas Petri suplementadas con diferentes concentraciones de NaCl, y se realizó la siguiente estrategia experimental (Figura 5).

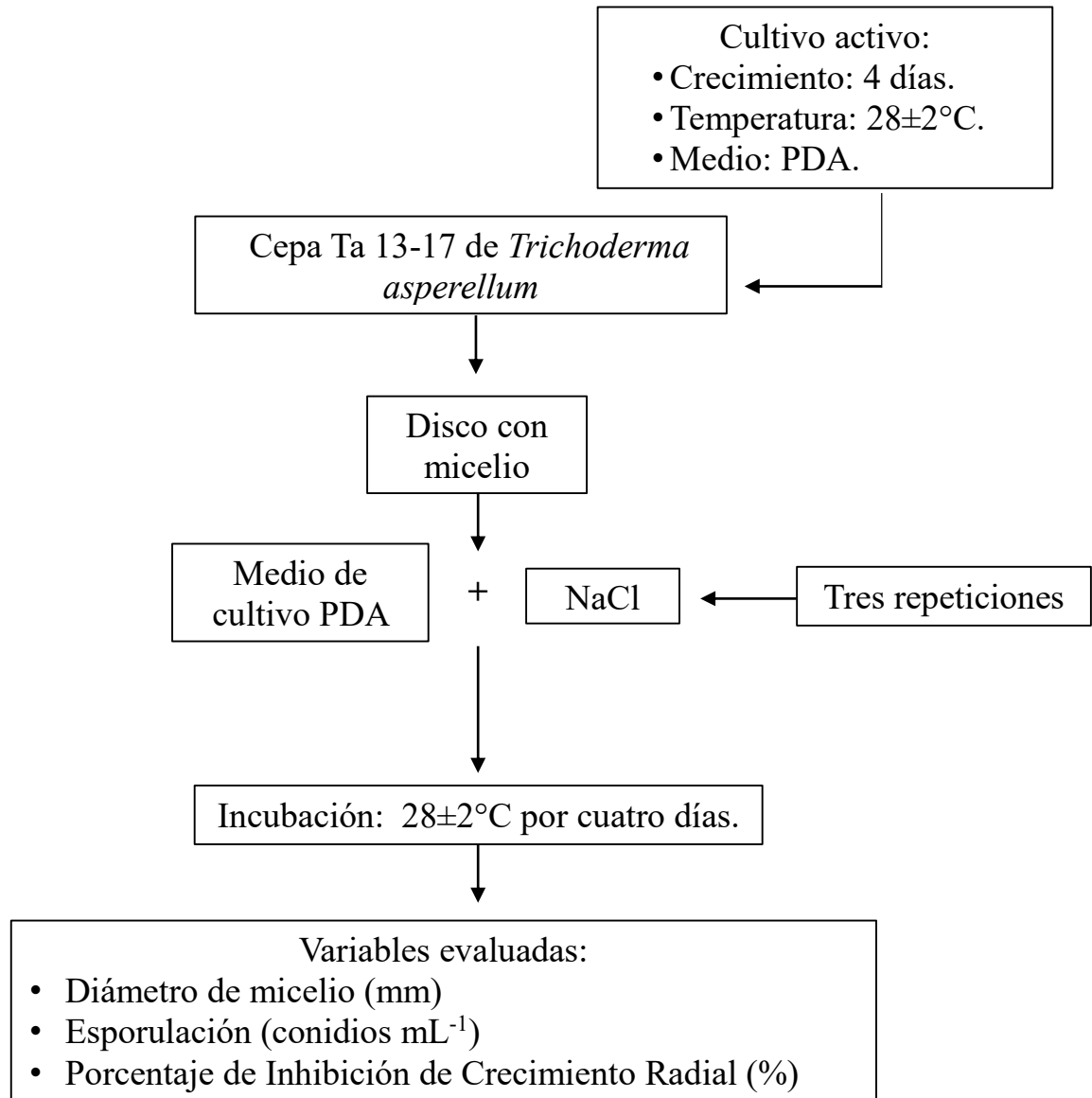


Figura 5. Estrategia experimental para establecer la tolerancia a la salinidad de *T. asperellum*.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1. Material biológico

Se utilizó la cepa Ta 13-17 de *T. asperellum*, aislada de raíces de *C. annuum* L. y caracterizada molecularmente por el grupo del Dr. Jairo Cristóbal Alejo, Profesor Investigador Titular del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán.

### 2.3.2. Preparación del inóculo

La cepa de *T. asperellum*, se cultivó en cajas Petri con medio PDA en donde se colocaron discos de papel Whatman de 6 mm de diámetro alrededor del inóculo, esto para que el hongo creciera sobre los discos y se utilizaran como inóculos. Cada experimento se realizó con un cultivo activo de cuatro días de crecimiento, incubados a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.3. Crecimiento *in vitro* de *T. asperellum* en presencia de NaCl

Se colocó un disco de micelio de *T. asperellum* de 6 mm de diámetro o 20  $\mu\text{L}$  de esporas [ $3.38 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ], en la parte central de cajas Petri con medio PDA suplementadas a diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 y 5 M), se realizaron tres repeticiones por cada concentración. Se incubaron a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante cuatro días para su crecimiento; los parámetros evaluados fueron: diámetro del micelio (mm); medido cada 24 horas hasta que el testigo alcanzó los bordes de la caja y esporulación; mediante el conteo de conidios (conidios  $\text{mL}^{-1}$ ) en cámara de Neubauer al finalizar el experimento. A partir de los valores obtenidos del diámetro de micelio, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (%PICR), con la fórmula de Abbot:

$$\% \text{PICR} = \frac{\text{Diámetro de control} - \text{Diámetro de tratamiento}}{\text{Diámetro de control}} \times 100$$

#### **2.3.4 Diseño experimental**

El diseño experimental fue completamente al azar, los resultados se analizaron mediante análisis de varianza simple, seguido de la prueba de múltiples rangos de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Realizado con ayuda del software statgraphics centurion XVI.

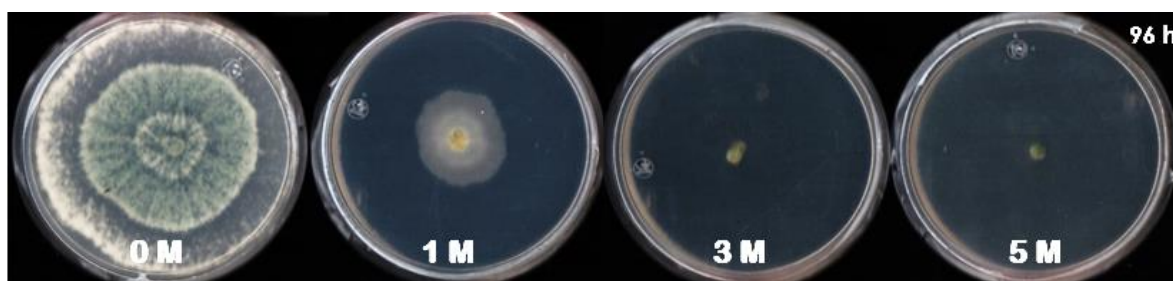
## 2.4 RESULTADOS

El efecto de NaCl a diferentes concentraciones sobre el crecimiento micelial de la cepa Ta 13-17 de *Trichoderma asperellum* en PDA se observó después de 24 h. Primero, se evaluaron ensayos a concentraciones de 0, 1, 3 y 5 M de NaCl (Cuadro 3) y la inoculación se realizó con disco micelial. No se observó crecimiento micelial a concentraciones máximas (3 y 5 M) (Figura 6), pero sí, a partir de la concentración de 1 M. Sin embargo, hubo una reducción en la velocidad y diámetro de crecimiento con respecto al testigo, esto se evidenció hasta las 48 h después de la inoculación (hdi).

**Cuadro 3. Diámetro de crecimiento del micelio (mm) de *T. asperellum* a concentraciones de 0, 1, 3, y 5 M de NaCl.**

[NaCl] M	Horas después de la inoculación				
	24	48	72	96	120
0	15.33±0.67 a	44.67±1.85 a	72.33±1.66 a	77.33±0.66 a	80±0 a
1	0±0 b	5.33±0.33 b	15±0.57 b	25±0.57 b	36±1.0 b
3	0±0 b	0±0 c	0± c	0±0 c	0±0 c
5	0±0 b	0±0 c	0± c	0±0 c	0±0 c
DMS	1.50907	4.26828	3.99261	1.99631	2.2636

\*Medias con letras diferentes entre columnas difieren significativamente, entre concentraciones a la misma hora, (Tukey, P≤0.05).



**Figura 6. Crecimiento de *Trichoderma asperellum* en medio PDA adicionado con 0, 1, 3 y 5 M de NaCl a las 96 hdi con disco micelial.**

Los resultados en Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR), mostraron que altas concentraciones de NaCl (3 y 5 M) se inhibió en un 100% el crecimiento de *T. asperellum* (Cuadro 4). No obstante, en presencia de 1 M de NaCl la inhibición fue de 88.06%

a las 48 h y a medida que pasaron los días este porcentaje disminuyó hasta un 55% a las 120 h lo que sugirió una adaptación de *T. asperellum* a las condiciones de salinidad.

**Cuadro 4. Inhibición de Crecimiento Radial (%) de *T. asperellum* a concentraciones de 0, 1, 3 y 5 M de NaCl.**

[NaCl] M	Horas después de la inoculación				
	24	48	72	96	120
0	0±0 <b>b</b>	0±0 <b>c</b>	0±0 <b>c</b>	0±0 <b>c</b>	0±0 <b>c</b>
1	100±0 <b>a</b>	88.06±0.74 <b>b</b>	79.26±0.79 <b>b</b>	67.67±0.74 <b>b</b>	55±1.25 <b>b</b>
3	100±0 <b>a</b>	100±0 <b>a</b>	100±0 <b>a</b>	100±0 <b>a</b>	100±0 <b>a</b>
5	100±0 <b>a</b>	100±0 <b>a</b>	100±0 <b>a</b>	100±0 <b>a</b>	100±0 <b>a</b>
DMS	0	1.69015	1.80351	1.68589	2.8295

\*Medias con letras diferentes entre columnas difieren significativamente, entre concentraciones a la misma hora (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

En cuanto a la producción de conidios, se observó una disminución significativa ( $P \leq 0.01$ ) en la producción de conidios a 1 M de NaCl con respecto al testigo (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Formación de conidios (conidios mL<sup>-1</sup>) de *T. asperellum* cultivado a las concentraciones de 0, 1, 3 y 5 M de NaCl durante 120 h.**

[NaCl] (M)			
0	1	3	5
$6.90 \times 10^8 \pm 5.51 \times 10^6$ <b>a</b>	$1.92 \times 10^6 \pm 1.61 \times 10^5$ <b>b</b>	0 <b>c</b>	0 <b>c</b>

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

En estas condiciones de salinidad, no se presentó crecimiento de micelio a las concentraciones de 3 y 5 M de NaCl por lo que se redujo el rango de concentraciones, y se repitió el ensayo. Las concentraciones evaluadas fueron 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl y se realizó la inoculación con disco micelial.

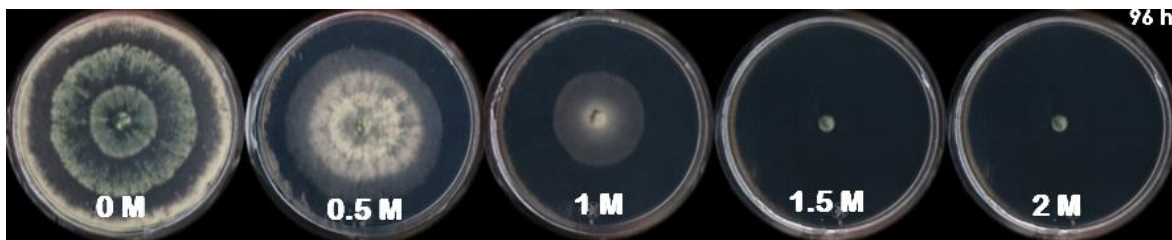
En este ensayo, se observó que a concentraciones de 1.5 y 2 M no hubo crecimiento de micelio en las 96 h. Sin embargo, a partir de la concentración de 0.5 M disminuyó la velocidad de crecimiento del hongo y el diámetro del micelio (Fig. 7), ya que se observó que a las 24 hdi creció 3 mm de diámetro con respecto al testigo (17.67 mm). Por el contrario, a concentraciones

de 1 M la aparición de micelio ocurrió hasta las 48 hdi, lo que significó una reducción del crecimiento micelial del 13.6% respecto al testigo (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Crecimiento del micelio (mm) de *T. asperellum* a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl inoculado con disco micelial.**

[NaCl] M	Horas después de la inoculación			
	24	48	72	96
0	17.67±0.33 a	46.33±0.33 a	74±0.57 a	79±0 a
0.5	3±0 b	21±0 b	38.67±0.33 b	53±1.0 b
1	0±0 c	6.33±0.33 c	17.33±0.33 c	28.33±0.33 c
1.5	0±0 c	0±0 d	0±0 d	0±0 d
2	0±0 c	0±0 d	0±0 d	0±0 d
DMS	0.693882	0.981297	1.55157	2.19425

\*Medias con letras diferentes entre columnas difieren significativamente, entre concentraciones a la misma hora (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).



**Figura 7. Crecimiento de *Trichoderma asperellum* en medio PDA adicionado con 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl a las 96 hdi del experimento.**

En cuanto al PICR (Cuadro 7) a concentraciones de 1.5 y 2 M de NaCl se observó un 100% de inhibición en las 96 h. El incremento de la salinidad fue proporcional al PICR, a pesar de ello, *T. asperellum* alcanzó 32.63 y 64.33%, a concentraciones de 0.5 y 1 M de NaCl, en su orden (Fig. 7).



**Cuadro 7. Inhibición de Crecimiento Radial (%) de *T. asperellum* a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl inoculado con disco micelial.**

[NaCl] M	Horas después de la inoculación			
	24	48	72	96
0	0±0 c	0±0 d	0±0 d	0±0 d
0.5	83±0 b	55±0 c	47.67±0.67 c	32.67±1.33 c
1	100±0 a	86.33±0.67 b	76.67±0.33 b	64.33±0.67 b
1.5	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a
2	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a
DMS	0	1.38776	1.55157	3.10313

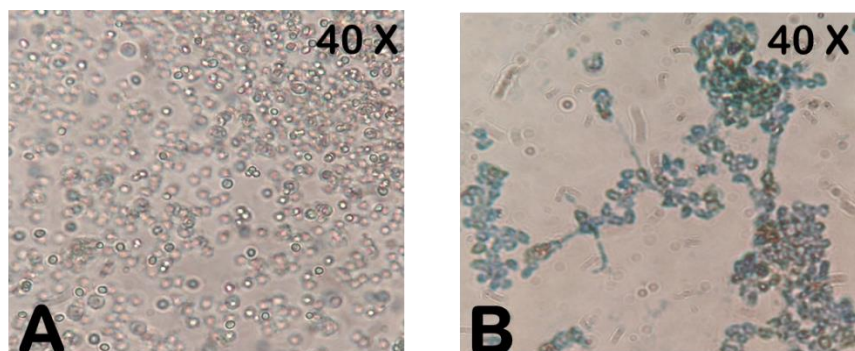
\*Medias con letras diferentes entre columnas difieren significativamente, entre concentraciones a la misma hora (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

El aumento de la concentración de NaCl disminuyó el número de conidios (Cuadro 8) y se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) en la concentración de 0.5 y 1 M, en comparación con el testigo. De manera cualitativa en el microscopio se observó una reducción en el tamaño de algunas esporas (Fig. 8).

**Cuadro 8. Formación de conidios (conidios mL<sup>-1</sup>) de *T. asperellum* cultivado a las concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl inoculado con disco micelial.**

[NaCl] M				
0	0.5	1	1.5	2
$2.17 \times 10^8 \pm 1.14 \times 10^7$ a	$2.08 \times 10^6 \pm 1.58 \times 10^5$ b	$4.85 \times 10^5 \pm 5.71 \times 10^4$ c	0 d	0 d

\*Medias con letras diferentes difieren significativamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).



**Figura 8. Concentración de conidios de *Trichoderma asperellum*, a partir de micelio. (Vista microscópica. A: 0 M de NaCl y B: 1 M de NaCl).**

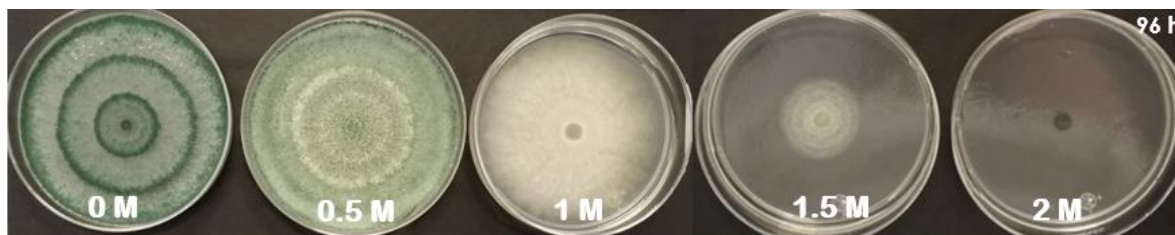
Con la finalidad, de estudiar el efecto del NaCl sobre la germinación de conidios de *T. asperellum*, se realizaron ensayos con las concentraciones anteriores (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M), pero mediante la inoculación con 20  $\mu$ L de una solución de conidios a una concentración de  $3.38 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ .

Hubo efectos significativos entre concentraciones ( $P \leq 0.01$ ). A partir de las 72 hdi, se observó la presencia de micelio a concentraciones de 1.5 M a las 72 h (Cuadro 9); mientras que el efecto de las concentraciones de 0.5 y 1 M fueron similares al experimento anterior, de igual manera, no se observó crecimiento de micelio a la concentración de 2 M de NaCl. Fue notorio la diferencia en el crecimiento del micelio y formación de conidios de *T. asperellum*; así como su capacidad para adaptarse en condiciones de salinidad (Fig. 7 y 9).

**Cuadro 9. Crecimiento del micelio (mm) de *T. asperellum* a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl inoculado con 20  $\mu$ L de una solución de conidios.**

[NaCl] M	Horas después de la inoculación			
	24	48	72	96
0	14.33 $\pm$ 0.33 a	43.67 $\pm$ 0 a	74.0 $\pm$ 0 a	79.0 $\pm$ 0 a
0.5	4 $\pm$ 0 b	20.33 $\pm$ 0.33 b	43.33 $\pm$ 0.33 b	53.33 $\pm$ 0.33 b
1	0 $\pm$ 0 c	7.33 $\pm$ 0.33 c	20.67 $\pm$ 0.33 c	39.33 $\pm$ 0.33 c
1.5	0 $\pm$ 0 c	0 $\pm$ 0 d	3 $\pm$ 0 d	12.33 $\pm$ 0.33 d
2	0 $\pm$ 0 c	0 $\pm$ 0 d	0 $\pm$ 0 e	0 $\pm$ 0 e
DMS	0.693882	1.69966	0.981297	1.20184

\*Medias con letras diferentes entre columnas difieren significativamente, entre concentraciones a la misma hora (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).



**Figura 9. Crecimiento de *Trichoderma asperellum* en medio PDA adicionado con 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl e inoculado con 20  $\mu$ L de una solución de conidios.**

En este ensayo se observó el 100% de inhibición de crecimiento radial a la concentración de 2 M de NaCl (Cuadro 10) a las 96 h se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre tratamientos; 32.07%, 50.21% y 92.41% para las concentraciones de 0.5, 1 y 1.5 M, esto con respecto al testigo. Incluso se observó que el aumento de la salinidad afectó la pigmentación natural de *T. asperellum*; verde oscuro (testigo) a coloraciones blanquesinas y amarillas (tratamientos con sal) (Figura 9). En este experimento no se realizó conteo de conidios.

**Cuadro 10. Inhibición de Crecimiento Radial (%) de *T. asperellum* a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 M de NaCl inoculados con 20  $\mu$ L de una solución de conidios [ $3.38 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ].**

[NaCl] M	Horas después de la inoculación			
	24	48	72	96
0	0±0 c	0±0 d	0±0 e	0±0 e
0.5	72.09±0 b	53.43±0.75 c	41.44±0.45 d	32.07±0.42 d
1	100±0 a	83.20±0.76 b	72.52±0.45 c	50.21±.42 c
1.5	100±0 a	100± a	95.95±0 b	92.41±0 b
2	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a
DMS	0	1.52126	1.32475	1.23643

\*Medias con letras diferentes entre columnas difieren significativamente, entre concentraciones a la misma hora (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

## 2.5 DISCUSIÓN

El estudio del efecto de la salinidad en las etapas del ciclo de vida de *Trichoderma asperellum* mostró intuitivamente que el efecto de inhibición del NaCl sobre el tamaño de la colonia, el crecimiento de micelios aéreos, la pigmentación y la producción de conidios fue más evidente con el aumento de las concentraciones de NaCl. Entre los solutos que muestran efectos negativos en el crecimiento y la fisiología de hongos, se encuentran el NaCl y KCl (Subbarao *et al.*, 1993; Lira-Méndez y Mayek-Pérez, 2006). Bajo estas condiciones el incremento en la concentración de solutos reduce el potencial hídrico y disminuye la disponibilidad de agua libre para el crecimiento de los hongos (Harris, 1981; Tijerina-Ramírez *et al.*, 2014). Los solutos en el agar atrapan moléculas de agua y no las deja disponibles para el hongo. La energía necesaria para obtener moléculas de agua del medio y así equilibrar potencial hídrico del citoplasma respecto al ambiente circundante, incrementa en la medida que se incrementa la concentración de solutos en el mismo. Así, el hongo se ve obligado a reducir su tasa de crecimiento en condiciones *in vitro*, pero mantiene el funcionamiento de sus sistemas enzimáticos (Folch-Mallol *et al.*, 2004). En este estudio la cepa Ta 13-17 de *T. asperellum* mostró mayor tolerancia a concentraciones elevadas de salinidad (1 M para micelio y 1.5 M para conidios) que la reportada en otros trabajos; tal es el caso de Pelizza *et al.* en donde encontraron que la presencia de NaCl (7 ppt) en el medio de cultivo redujo el crecimiento de un aislado de *Lepoegnina chapmanii* (Pelizza *et al.*, 2007). En cuatro especies de *Trichoderma* la aplicación de 1000  $\mu\text{M}$  de NaCl, inhibió significativamente el crecimiento de micelio (Zehra *et al.*, 2017). Un resultado similar al de este estudio fue el de Leo Daniel *et al.* (2011) quienes evaluaron *in vitro* concentraciones de salinidad (0.1, 0.5, 0.75, 1.25, 1.5 y 2 M) en *T. viride* y observaron una disminución en el crecimiento con el aumento de salinidad y crecimiento micelial hasta la concentración de 1.5 M y a 2 M el crecimiento se inhibió por completo. Se ha visto que el ión  $\text{Na}^+$  puede tener efectos negativos o positivos en el metabolismo celular. En altas concentraciones fuera de las células puede modificar las rutas implicadas en el transporte de agua. Se ha calculado que una concentración de sal de 50-150 mM corresponde a la fuerza iónica que se encuentra dentro del citoplasma de muchos organismos y, existe evidencia que demuestra

que estas concentraciones tienen efectos positivos en la estructura de las proteínas, debido a las fuerzas electrostáticas que se generan. También, se ha demostrado que altas concentraciones salinas (más de 300-500 mM) inhiben las reacciones metabólicas ya que perturban el balance hidrofóbico-electrostático lo que afecta el funcionamiento proteínico (Folch-Mallol *et al.*, 2004). En hongos como *Fusarium* las concentraciones mayores a 500 mM redujeron el crecimiento de manera significativa en comparación con el testigo (Lira-Méndez y Mayek-Pérez, 2006). Por otra parte, en una cepa de *T. asperellum* (E-100) fue capaz de crecer a una concentración de 2 M de NaCl, pero no fue así, con la cepa de *T. hamatum* (E-228) la cual no creció en ninguna concentración de NaCl (Dastogeer *et al.*, 2018). En este estudio a partir de 500 Mm, *T. asperellum* (Ta 13-17) mostró una disminución significativa en el crecimiento y esporulación. En estudios observaron que la reducción del potencial osmótico provocó la reducción en el crecimiento micelial algodonoso en *F. moniliforme*, lo que se interpretó como un mecanismo de adaptación a condiciones desecantes (Griffith y Boddy, 1991; Subbarao *et al.*, 1993). Las condiciones salinas, la hipersalina en particular, podrían inhibir el crecimiento celular (Samapundo *et al.*, 2010; Garg & Chandel, 2012). En hongos, se ha demostrado que el estrés de salinidad afecta la formación de esclerocios (Elabyad *et al.*, 1988). Sin embargo, los hongos podrían adaptarse a las condiciones hipersalinas principalmente a través de la vía del glicerol de alta osmolaridad (HOG). Además, el estrés salino y los elementos de respuesta relacionados con la vía HOG juegan un papel importante en la biosíntesis del segundo metabolismo (Ochiai *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2004). Uno de los ajustes fisiológicos en el crecimiento microbiano a una actividad reducida del agua es la acumulación de sustancias intercelulares específicas, así como los cambios en sus vías biosintéticas (Soliman *et al.*, 1994), que son osmolitos metabólicamente neutros que también pueden ser osmoprotectores (Anthony *et al.*, 1998).

Además, el estrés salino puede inducir la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios que, en algunos hongos, es una estrategia efectiva para la resistencia al estrés (Kawahara *et al.*, 2002). En este estudio, el cambio de pigmentación de verde oscuro a colores verde claro, amarillento y blanco (Figura 9), y la reducción en el diámetro del micelio al aumentar la concentración de sal, coincidió con el trabajo en *T. harzianum* en medios salinos, donde se

observaron en el área esporógena menos densa en correlación con el aumento de las concentraciones de sal, a  $8 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl la coloración verde desapareció por completo y el medio se invadió solo con micelios blanquecinos (Regragui & Lahlou, 2005). Así mismo, en agares nutritivos que contienen 5% (856 mM) de NaCl, el crecimiento de *Trichoderma* mostraron una coloración blanquecina en lugar de la pigmentación verde característica (Gindrat, 1977). El mismo efecto se observó en *Verticillium dahliae* (Ioannou *et al.*, 1977) y *Macrophomina phaseolina* (Cervantes-García *et al.*, 2003) con 500 mM o mayores concentraciones de NaCl. En *Monascus purpureus* el aumento de pigmentos podría ser un mecanismo defensivo bajo estrés salino, ya que actúa como antioxidante (Zhen *et al.*, 2019). Ya que el estrés salino puede conducir a una toxicidad metabólica debido al estrés oxidativo causado por ROS, otra estrategia para combatir los efectos del estrés salino es hacer uso del sistema de defensa de los organismos para eliminar ROS, que incluye enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos, como CAT, SOD y GSH (Fountain *et al.*, 2016). Este cambio de coloración podría deberse a que el NaCl es tóxico, de modo que modifica la ruta de síntesis de pigmentos tales como la melanina o bien, altera la expresión de genes relacionados con la síntesis de melanina y otros pigmentos (Ioannou *et al.*, 1977). La naturaleza exacta de los pigmentos conidiales en *Trichoderma* spp. quedan por determinarse; sin embargo, los intentos de identificar el pigmento sugirieron que un polifenol similar a la melanina no indólico es el responsable de la pigmentación verde oscuro (Benitez *et al.*, 1976; Hermosa *et al.*, 2014). Las antraquinonas son metabolitos secundarios bien conocidos de *Trichoderma* spp. (Slater *et al.*, 1967) y son responsables de la coloración marrón, gris y en ocasiones amarillento (Betina, 1995; Siddiquee, 2014; Contreras-Cornejo *et al.*, 2016).

Otro mecanismo de tolerancia a la salinidad es el control en la homeostasis celular, la cual no está elucidada específicamente para hongos de tipo filamentoso como lo es *T. asperellum*. Sin embargo, los avances recientes en la taxonomía de *Trichoderma*, respaldados por el análisis molecular de regiones variables de ADN genómico (Fanelli *et al.*, 2018) encontraron dominios que codifican para proteínas transmembranales y ATPasas asociadas a la membrana, mismas que comparten muchos hongos, con adaptaciones para sus contextos fisiológicos individuales. Cuando *Saccharomyces cerevisiae* se enfrenta a una situación de

estrés por NaCl, la respuesta se centra en mantener una homeostasis adecuada del ion  $\text{Na}^+$  al regular no sólo su concentración interna sino al mantener una relación alta  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Para prevenir una toma excesiva de  $\text{Na}^+$  (mediante la ATPasa de  $\text{Na}^+$  (Ena1p), el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Nha1p)), los canales de  $\text{K}^+$  (Trk1p, Trk2p, Kha1p, Tok1p y Nsc1p) (Wadskog & Adler, 2003; Folch-Mallol *et al.*, 2004) cambian de un estado de baja afinidad a otro de alta afinidad lo cual les permite discriminar entre los dos iones e incorporar, preferencialmente,  $\text{K}^+$ . Por otro lado, el exceso de  $\text{Na}^+$  que entra a la célula se expulsa a través de una ATPasa de tipo P codificada por el gen ENA1 y por una proteína antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Nha1p) (Garcia-deblas *et al.*, 1993; Prior *et al.*, 1996; Wieland *et al.*, 1995). El ion que se alcanza a acumular intracelularmente es removido al internalizarlo en la vacuola. El transportador que lleva a cabo esta compartimentalización es Nhx1p, el cual requiere un gradiente de protones que es generado tanto por la ATPasa como por la pirofosfatasa, ambas proteínas vacuolares. (Gaxiola *et al.*, 1999) Cabe mencionar que estudios fisiológicos sugieren que en la membrana plasmática de esta levadura existe un canal inespecífico de entrada de cationes denominado NSC1, por el cual también pudiera ingresar el  $\text{Na}^+$  (Tamás & Hohmann, 2003). La célula puede utilizar diferentes estrategias de adaptación en respuesta a condiciones de estrés por salinidad.

La producción de conidios resultó afectada por el aumento de la salinidad en el medio, fue hasta la concentración de 1 M de NaCl mediante inoculación con micelio, en donde se observó presencia de conidios ( $4.85 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ), sin embargo, hubo una reducción significativa en número con respecto al testigo ( $2.17 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ). De la misma manera, el estrés salino tuvo efectos perjudiciales significativos en el crecimiento, esporulación y actividad antagonista del aislado de tipo salvaje de *T. harzianum* contra *F. oxysporum* (Kredics *et al.*, 2000). El desarrollo de *T. asperellum* mediante inoculación con solución de conidios permitió observar crecimiento de micelio en medios de hasta 1.5 M de NaCl. El uso comercial de conidios de *Trichoderma* para su uso en la protección de las plantas ha sido ampliamente reportado (Hermosa *et al.*, 2012), debido a la resistencia de las esporas al estrés ambiental. Esta resistencia es atribuible a la morfología única de la spora, que está formada por varias capas: el núcleo, la corteza, el abrigo o pelaje, la capa y, en algunos casos, el exosporium (Barák, 2017).

Las capas superficiales de las esporas (capa y exosporio) contribuyen a la resistencia de las esporas a tensiones físicas y químicas extremas, que incluyen la exposición a condiciones extraterrestres simuladas (Nicholson, 2004; Nicholson *et al.*, 2000). Los cambios en el tamaño de las esporas (Figura 8) también se han documentado por microscopía óptica para las esporas de *Bacillus thuringiensis* en respuesta a los cambios en la humedad relativa (Westphal *et al.*, 2003). Estas observaciones sugieren que la capa de esporas puede adaptarse a los cambios físicos debido a la hinchazón o contracción de las esporas, presumiblemente causada por la contracción o expansión de la corteza o núcleo de las esporas, sin cambiar su área de superficie (Westphal *et al.*, 2003).



## 2.6 CONCLUSIONES

El rango de concentración de NaCl que toleró *Trichoderma asperellum* (Ta 13-17) fue de 0-1.5 M, con desarrollo del micelio a 1 M y germinación de conidios hasta 1.5 M. Las altas concentraciones de sales disminuyeron el número y tamaño de los conidios.

## CAPÍTULO III

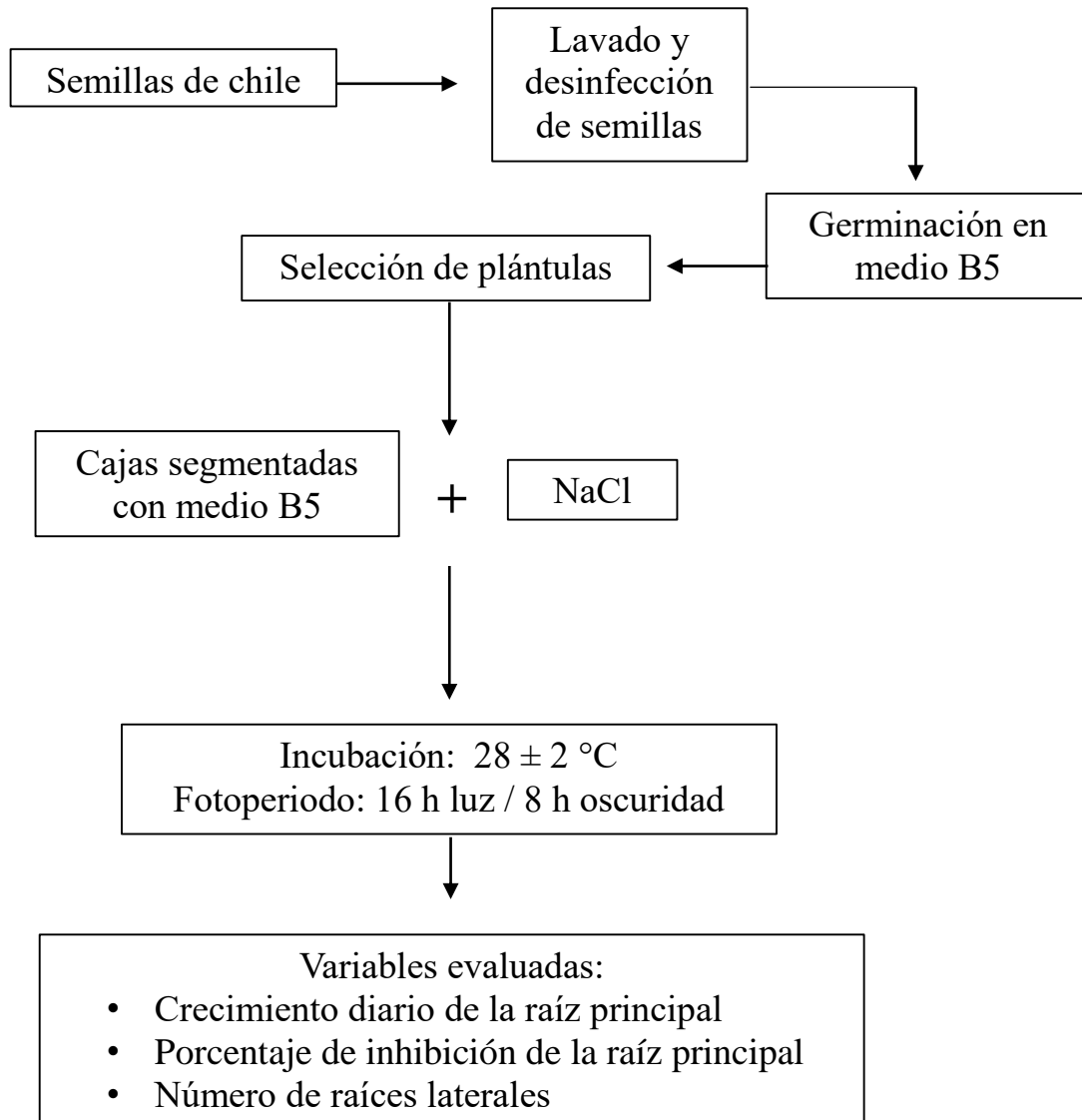
### Efecto del NaCl en el crecimiento del sistema radicular de plántulas de chile (*Capsicum* spp.) en un modelo *in vitro*

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Las raíces es el sitio de intercambio iónico y el principal órgano de las plantas que entra en contacto directo con las concentraciones de sal del suelo (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2016). El sodio ( $\text{Na}^+$ ) entra a la raíz en forma pasiva desde el ambiente externo al citoplasma de las células epidérmicas y del cortex. La entrada pasiva de  $\text{Na}^+$  a la raíz depende del gradiente de concentración y la diferencia de potencial a través de la membrana plasmática (Apse y Blumwald, 2007). La primera barrera para el movimiento de iones en la raíz, son las células epidérmicas, las cuales permiten a la mayoría de las plantas excluir alrededor del 98% de las sales en la solución del suelo, y entrar al xilema sólo el 2% de las sales (Munns *et al.*, 2005; Plett y Moller, 2010). En general, el exceso de sales solubles en la zona de la raíz reduce el agua disponible de la planta, se ha reportado que el NaCl, además de reducir el crecimiento y el desarrollo de las raíces, modifica la arquitectura de la raíz (Julkowska *et al.*, 2014), y que en esta respuesta intervienen factores de transcripción y hormonas vegetales (Duan *et al.*, 2013; Julkowska & Testerink 2015). Se ha reportado que con salinidad la tasa de elongación de la raíz se reduce en una amplia gama de especies, como *Arabidopsis thaliana*, *Citrus* spp., *Oryza* spp., *Triticum* spp. y *Zea mays* (Zhu *et al.*, 1998). En la raíz primaria, se han observado cambios en la dirección del crecimiento (halotropismo) en presencia de un gradiente salino (Galvan-Ampudia *et al.*, 2013). Bajas concentraciones de NaCl pueden estimular el crecimiento primario de la raíz (Zolla *et al.*, 2010), mientras que altas concentraciones detienen el crecimiento de la raíz al inhibir la progresión del ciclo celular y la división celular (Jung y McCouch, 2013). El grado en que la salinidad reduce el crecimiento difiere mucho en cada especie y en menor medida, en las variedades (Ghoulam *et al.*, 2002).

### 3.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Semillas de chile fueron cultivadas en condiciones *in vitro* y sometidas a estrés salino con NaCl, para estudiar el efecto de la sal sobre el crecimiento de las raíces. Se midió el crecimiento de la raíz principal y el número de raíces laterales (Figura 10).



**Figura 10. Estrategia experimental para evaluar el efecto de la salinidad en el sistema radicular las plántulas de chile (*Capsicum* spp.)**

### **3.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.3.1. Material vegetal**

Las semillas fueron obtenidas a partir de frutos maduros de chile habanero (*C. chinense*) y chile siete caldos (*C. annuum*) colectados en cultivos ubicados en Conkal, Yucatán y La Trinitaria, Comitán de Domínguez, Chiapas; respectivamente.

#### **3.3.2. Desinfección y germinación de semillas**

Las semillas se desinfectaron bajo condiciones asépticas mediante un lavado con etanol al 80% (v/v) por 5 min, seguido de la inmersión en 30% de hipoclorito de sodio de marca comercial (Cloralex, 6% NaOCl) durante 15 min, posteriormente se realizaron lavados continuos con agua destilada estéril y se incubaron con ácido giberélico (400 ppm) durante 24 h a 4°C en oscuridad. Posteriormente, las semillas fueron colocadas en cajas Petri con medio B5 para la germinación.

#### **3.3.3. Tratamientos con NaCl**

Se seleccionaron solo las semillas cuya radícula media de 5 - 8 mm y se colocaron en cajas Petri cuadradas segmentadas con medio B5 suplementadas con NaCl (0, 75 y 150 mM). Las condiciones de incubación fueron a una temperatura de 28°C y un fotoperíodo de 16/8 h (luz/oscuridad). Las variables que se midieron fueron: crecimiento de raíz principal y número de raíces laterales. El experimento culminó hasta que la raíz principal de las plántulas testigo llegó al borde de la caja Petri.

#### **3.3.4. Diseño experimental**

El diseño experimental fue completamente al azar, los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de dos y una vía, seguido de la prueba de medias por el método de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.4 RESULTADOS

La respuesta del sistema radicular de dos especies de *Capsicum*, chile siete caldos (CSC) y habanero criollo (CHC) a altas concentraciones de NaCl, difirieron entre las especies de *Capsicum*. Los resultados indicaron que el crecimiento diario de la raíz principal disminuyó a medida que se incrementó la concentración de NaCl en las dos especies evaluadas. Esta inhibición fue más notoria a 150 mM; sin embargo, en CSC no hubo una diferencia significativa entre 75 y 150 mM a excepción de las primeras 24 h. En CHC, si se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) en todos los tratamientos con respecto al control, se observó una disminución del crecimiento conforme se aumentó la salinidad. (Cuadro 11; Fig. 11).

**Cuadro 11. Efecto de concentraciones de NaCl (mm) en el crecimiento de la raíz principal de plántulas de *Capsicum* spp.**

Tiempo	Variedad	[mM de NaCl]			
		0	75	150	DMS <sup>a</sup>
24 h	CSC	7.75 ± 0.92 aA	7.5 ± 0.5 aA	1.62 ± 0.42 bA	2.58535 <sup>a</sup>
	CHC	9.75±0.43 aA	5.12±0.80 bB	1.12±0.71 cA	2.64229 <sup>a</sup>
	DMS <sup>A</sup>	2.49738 <sup>A</sup>	2.30923 <sup>A</sup>	2.04419 <sup>A</sup>	
48 h	CSC	6.37±1.02 aB	3.25±1.79 aA	2.12±0.77 aA	5.03816 <sup>a</sup>
	CHC	12.5±0.28 aA	6.25±0.85 bA	1.37±0.62 cA	2.50021 <sup>a</sup>
	DMS <sup>A</sup>	2.61331 <sup>A</sup>	4.86828 <sup>A</sup>	2.43414 <sup>A</sup>	
72 h	CSC	11.25±1.10 aA	4.25±2.17 bA	1.62±0.98 bA	6.0015 <sup>a</sup>
	CHC	10.5±0.54 aA	3.87±0.51 bA	0.37±0.23 cA	1.78695 <sup>a</sup>
	DMS <sup>A</sup>	3.01759 <sup>A</sup>	5.46863 <sup>A</sup>	2.48486 <sup>A</sup>	
96 h	CSC	12.87±1.19 aA	4.87±2.43 bA	1.5±0.95 bA	6.55947 <sup>a</sup>
	CHC	8.25±0.32 aB	3.62±0.94 bA	1.0±0.70 bA	2.78684 <sup>a</sup>
	DMS <sup>A</sup>	3.03305 <sup>A</sup>	6.39152 <sup>A</sup>	2.91242 <sup>A</sup>	
120 h	CSC	10.37±1.88 aA	4.87±2.29 abA	1.5±0.61 bA	6.91299 <sup>a</sup>
	CHC	8.87±0.31 aA	2.75±0.75 bA	0.15±0.11 cA	1.87359 <sup>a</sup>
	DMS <sup>A</sup>	4.67883 <sup>A</sup>	5.90723 <sup>A</sup>	1.52647 <sup>A</sup>	
144 h	CSC	11.75±2.17 aA	4.75±2.21 abA	1±0.45 bA	7.14779 <sup>a</sup>
	CHC	8.0±0.70 aA	2.25±1.43 bA	0.87±0.31 bA	3.71861 <sup>a</sup>
	DMS <sup>A</sup>	5.59546 <sup>A</sup>	6.45464 <sup>A</sup>	1.35642 <sup>A</sup>	
168 h	CSC	10.12±1.55 aA	4.75±2.20 abA	0.62±0.23 bA	6.17703 <sup>a</sup>
	CHC	6.87±0.82 aA	1.62±0.55 bA	0.37±0.23 bA	2.33221 <sup>a</sup>
	DMS <sup>A</sup>	4.31837 <sup>A</sup>	5.55912 <sup>A</sup>	0.828286 <sup>A</sup>	

Letras minúsculas: medias con letras diferentes entre filas difieren significativamente, comparación entre concentraciones en cada variedad; letras mayúsculas: medias con letras diferentes entre columnas difieren significativamente, comparación entre variedades a la misma concentración. (CSC: chile siete caldos, CHC: chile habanero criollo).

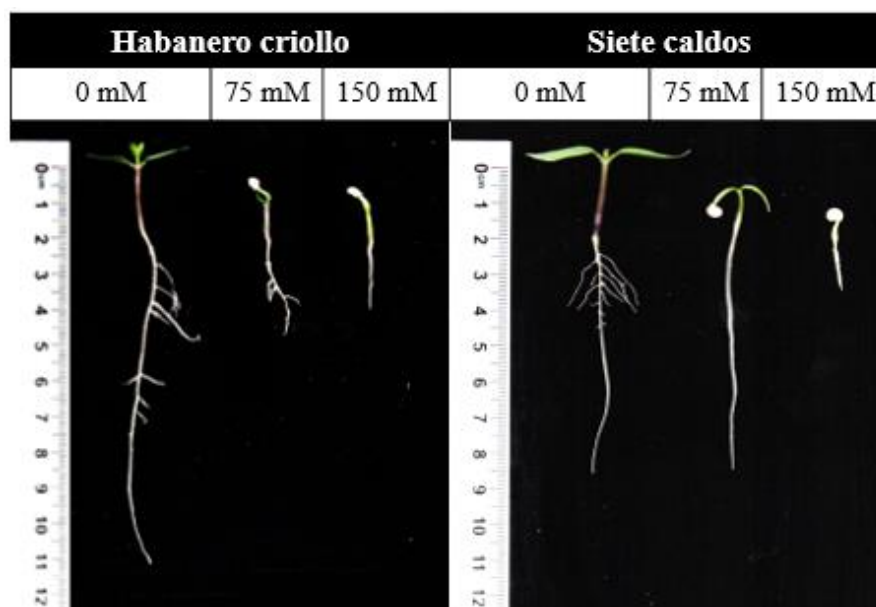
Al finalizar el experimento, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento de la raíz principal, cuando en el tratamiento testigo, el ápice tocó los bordes de la caja (Cuadro 12). En CSC no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de 75 y 150 mM de NaCl ( $P \leq 0.1$ ), pero si respecto al control ( $P \leq 0.01$ ). En cambio, CHC hubo diferencias entre las concentraciones y el testigo ( $P \leq 0.01$ ). Al comparar entre las especies a la misma concentración no se encontraron diferencias ( $P \leq 0.1$ ) en el porcentaje de inhibición de la raíz principal.

**Cuadro 12. Efectos de tratamientos en la inhibición de crecimiento de la raíz principal (%).**

Variedad	[mM de NaCl]			DMS <sup>a</sup>
	0	75	150	
CSC	0±0 aA	51.41±18.71 bA	85.81±5.43 bA	44.427 <sup>a</sup>
CHC	0±0 aA	59.84±5.95 bA	91.69±3.38 cA	15.6092 <sup>a</sup>
DMS <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	48.0579 <sup>A</sup>	15.6763 <sup>A</sup>	

Letras minúsculas: medias con letras diferentes entre columnas difieren significativamente, comparación entre concentraciones en cada variedad; letras mayúsculas: medias con letras diferentes entre filas difieren significativamente, comparación entre variedades a la misma concentración. (CSC: chile siete caldos, CHC: chile habanero criollo).

En la figura 11, se observa la raíz principal y el desarrollo de las raíces laterales en el control y a 75 mM. A 150 Mm; hay una reducción del crecimiento de la raíz principal y ausencia de raíces laterales en ambas especies. Sin embargo, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas ( $P \leq 0.1$ ) entre especies.



**Figura 11. Efecto del NaCl en el sistema radicular de plántulas de *Capsicum* spp.**

En el Cuadro 13 se muestra el promedio de raíces laterales por planta, se evidenció que se formó 1.5 y 1.25 en CSC y CHC, respectivamente, en el tratamiento de 75 mM de NaCl. En la especie CSC el promedio de raíces laterales formadas por plántula no tuvo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.1$ ), caso contrario al CHC que los tratamientos salinos tuvieron diferencia ( $P \leq 0.01$ ) con respecto al control, mas no entre ellos.

**Cuadro 13. Efecto de tratamientos en la formación de raíces laterales en plántulas de *Capsicum* spp.**

Variedad	[mM de NaCl]			DMS <sup>a</sup>
	0	75	150	
CSC	5.5±2.90 aA	1.5±0.95 aA	0±0 aA	6.96369 <sup>a</sup>
CHC	7.5±1.5 aA	1.25±0.62 bA	0±0 bA	3.70768 <sup>a</sup>
DMS <sup>A</sup>	7.9916 <sup>A</sup>	2.8033 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	

Letras minúsculas: medias con letras diferentes entre columnas difieren significativamente, comparación entre concentraciones en cada variedad; letras mayúsculas: medias con letras diferentes entre filas difieren significativamente, comparación entre variedades a la misma concentración. (CSC: chile siete caldos, CHC: chile habanero criollo).



En cuanto al porcentaje de plántulas que desarrollaron raíces laterales (RL), éste disminuyó conforme aumentó la salinidad. En CHC un 75% y 50% en CSC a 75 mM. A una concentración de 150 mM no se presentó formación de RL en ninguna de las dos especies en comparación con el control (Cuadro 14). Fue CHC, la especie con mayor número de raíces laterales.

**Cuadro 14. Efecto de tratamientos en el porcentaje de plántulas de *Capsicum* spp. con raíces laterales.**

Variedad	[mM de NaCl]		
	0	75	150
CSC	75%	50%	0%
CHC	100%	75%	0%

CSC: chile siete caldos, CHC: chile habanero criollo.

En cuanto al peso fresco, éste disminuyó conforme se aumentó la concentración de NaCl. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.1$ ) en presencia del estrés, pero si en comparación con el control. Entre especies, se presentó únicamente diferencia significativa en el peso del sistema radicular de las plántulas de CHC y CSC en el tratamiento de 75 mM (Cuadro 15).

**Cuadro 15. Efecto de tratamientos en el peso fresco de plántulas de *Capsicum* spp.**

Tejido	Variedad	Peso Fresco (g)			DMS <sup>a</sup>
		0 mM	75 mM	150 mM	
Parte aérea	CSC	0.0356±0.0042 aA	0.0220±0.0029 bA	0.0119±0.0006 bA	0.0120 <sup>a</sup>
	CHC	0.0376±0.0023 aA	0.0179±0.0005 bA	0.0143±0.0014 bA	0.0063 <sup>a</sup>
	DMS <sup>A</sup>	0.0119448 <sup>A</sup>	0.00747437 <sup>A</sup>	0.00376897 <sup>A</sup>	
Sistema radicular	CSC	0.0126±0.0011 aA	0.0068±0.0007 bA	0.0045±0.0008 bA	0.0037 <sup>a</sup>
	CHC	0.0141±0.0016 aA	0.0046±0.0002 bB	0.0024±0.0003 bA	0.0039 <sup>a</sup>
	DMS <sup>A</sup>	0.00496243 <sup>A</sup>	0.00194731 <sup>A</sup>	0.00233795 <sup>A</sup>	

Letras minúsculas: medias con letras diferentes entre filas difieren significativamente, comparación entre concentraciones en cada variedad; letras mayúsculas: medias con letras diferentes entre columnas difieren significativamente, comparación entre variedades a la misma concentración. (CSC: chile siete caldos, CHC: chile habanero criollo).

Fue evidente que las altas concentraciones de NaCl afectaron de manera negativa el desarrollo del sistema radicular de plántulas de *Capsicum* spp., la especie CHC presentó mayor disminución en comparación a CSC, en la mayoría de los parámetros evaluados, lo que sugirió que CHC fue la especie más sensible a la salinidad (Fig. 12).

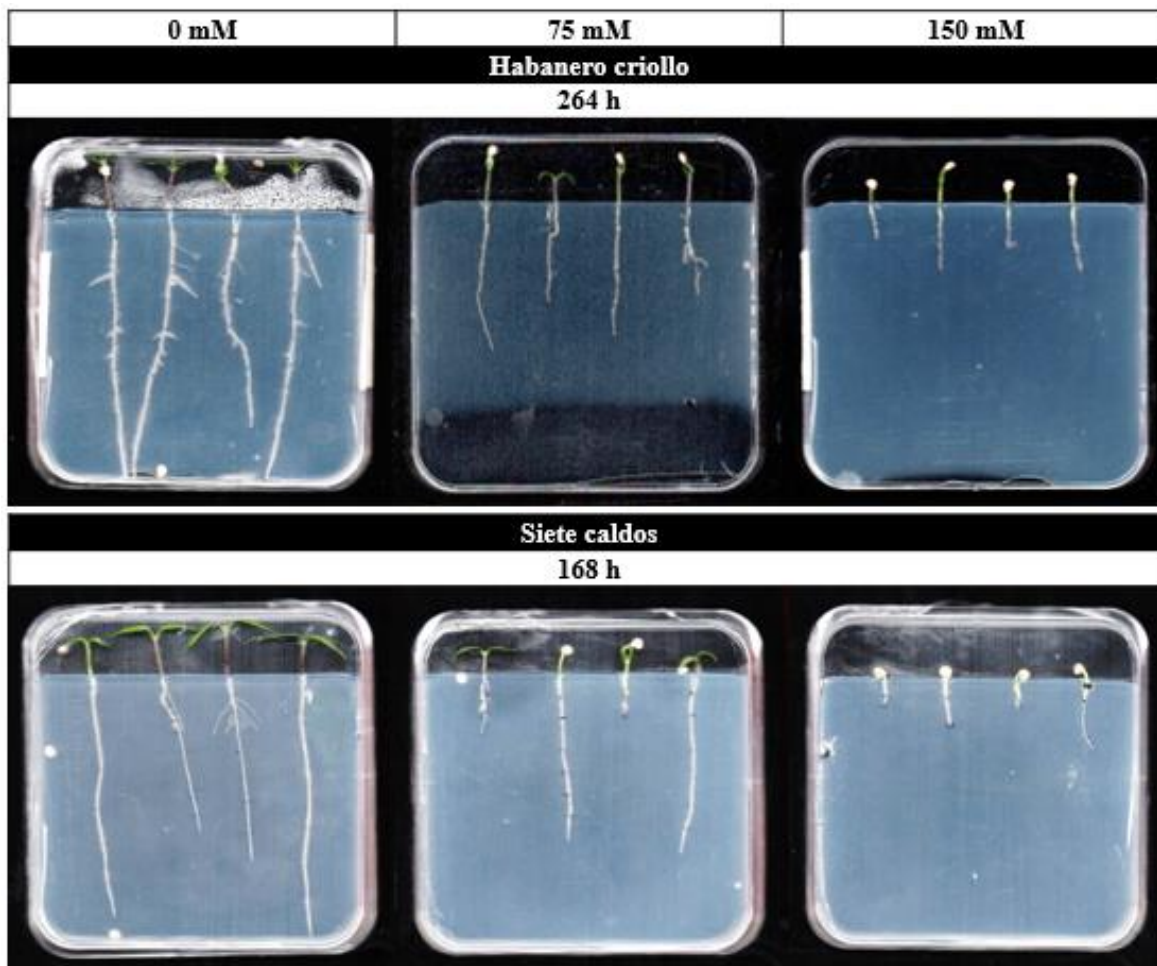


Figura 12. Fotografías de los ensayos al finalizar el experimento.

### 3.5 DISCUSIÓN

Las diferencias mostradas entre las variedades de *Capsicum* (CSC: siete caldos y CHC: habanero criollo) en la inhibición del crecimiento de la raíz principal (RP), el número de raíces laterales (RL) y peso fresco se atribuyeron a la respuesta de éstas al estrés salino. Se ha demostrado que la respuesta al estrés depende de la duración, de su concentración y de la especie. Las especies de *Capsicum* se consideran susceptibles al estrés salino; esta susceptibilidad depende de la especie, incluso de la variedad. Un cultivo de *Capsicum* afectado por salinidad puede mostrar una disminución en el crecimiento, alteraciones en la permeabilidad de la membrana, la conductancia estomática, la fotosíntesis y el equilibrio iónico (Sonneveld, 1988; Bethke & Drew, 1992; Carvajal *et al.*, 1999; Shannon & Grieve, 1999; Navarro *et al.*, 2003; Cabanero *et al.*, 2004).

Se sabe que concentraciones de NaCl entre 0 y 150 mM afectan el crecimiento de las plantas de Chile, aunque depende del genotipo, la especie y la condición de crecimiento (Aktas *et al.*, 2006; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2012, 2014). Dado que las células, tejidos y órganos están adaptados para realizar funciones específicas y diversas, la duración y el impacto del estrés salino en diferentes partes de la planta pueden diferir durante las primeras etapas de crecimiento (Julkowska & Testerink, 2015). En relación a la sensibilidad a la sal con la etapa de crecimiento, una observación general es que en las etapas de crecimiento tempranas (plántulas, establecimiento) son más sensibles al estrés salino que en las etapas posteriores (Machado & Serralheiro, 2017). En este estudio, la variedad CSC, en la inhibición de la raíz principal, no evidenció diferencia significativa entre la exposición a 75 y 150 mM de NaCl lo que sugiere mayor tolerancia a la sal en comparación con la variedad CHC que mostró diferencias de 0-150 Mm (Cuadro 11). Las raíces principales de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) redujeron su crecimiento cuando estuvieron expuestas a un medio con NaCl (100 Mm), además se reportó reducciones en la longitud de la zona de elongación de la punta de la raíz (7 mm en el control, en comparación con 4 mm cuando se añadió NaCl), en la longitud de las células epidérmicas y en la tasa aparente de producción celular (Zidan *et al.*, 1990).

En muchas plantas, el crecimiento de las raíces disminuye en presencia de NaCl debido a la reducción de la división y a la tasa de alargamiento de las células epidérmicas, probablemente en respuesta al estrés osmótico (Kurth *et al.*, 1986; Zidan *et al.*, 1990). Otra característica que respalda esta sugerencia es que, la emergencia de las primeras hojas verdaderas en la plántula fue mayormente visible en CSC (en 0 y 75 mM) que en CHC (únicamente en 0 mM). A concentraciones de 150 mM estas hojas no lograron emerger completamente de la testa en ambas variedades (Figura 12). Se ha visto que, el crecimiento del brote de las plántulas de olivo es más sensible a la salinidad que el crecimiento de la raíz (Perica *et al.*, 2008; Cimato *et al.*, 2010). Durante la germinación y la emergencia, la determinación de la tolerancia se basa en el porcentaje de supervivencia, mientras que, durante las etapas de desarrollo posteriores, la tolerancia generalmente se mide como una reducción relativa del crecimiento (Läuchli & Grattan, 2007). También en *Arabidopsis* se demostró que el estrés salino aumenta la producción de raíces laterales y suprime el alargamiento de la raíz principal (He *et al.*, 2005), en arroz induce la muerte celular programada en las puntas de las raíces (Li *et al.*, 2007), y en tomate aumenta la tasa de mortalidad de raíces en accesiones sensibles (Snapp y Shennan, 1992). En otro estudio, el aumento de los niveles de NaCl hasta 50 mM estimuló la producción de raíces laterales, donde las plántulas exhibieron prácticamente el doble de raíces laterales de primer orden (RL emergentes) después de 21 días que el control (NaCl 0 mM) y también produjeron algunas RL de segundo orden. Sin embargo, la transferencia de plántulas a estrés salino de 100 mM causó una inhibición casi completa del desarrollo de raíces laterales. Estos resultados sugieren una respuesta de aclimatación del desarrollo de RL a niveles leves de estrés salino (Zolla *et al.*, 2010). Las raíces laterales representan la mayoría de la masa de raíces en la mayoría de los sistemas de raíces de plantas y realizan funciones clave en la exploración del suelo, la absorción de nutrientes y agua, y el desarrollo de simbiosis. Si bien la producción de RL es generalmente de desarrollo, también puede ser adaptativa, en respuesta a las influencias ambientales dentro de la rizosfera (Coudert *et al.*, 2010).

Las plantas se estresan de dos maneras; en un ambiente con alto contenido de sal, por un aumento del potencial osmótico en el medio de enraizamiento y por el efecto tóxico de una alta concentración de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Munns 2002; Gapińska *et al.*, 2007). Ya que el sistema radicular es

el primer sitio de detección y la primera línea de defensa contra el exceso de  $\text{Na}^+$  (Ji *et al.*, 2013; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014), existen canales de cationes no selectivos (NSCC) u otros transportadores (transportadores de  $\text{K}^+$  de alta afinidad (HKT) y transportadores de cationes de baja afinidad (LCT) que son los principales responsables de la entrada de  $\text{Na}^+$  en la célula (Demidchik & Tester, 2002; Apse & Blumwald, 2007; Plett & Moller, 2010; Maathuis, 2014). Como se sugiere para otras especies (Demidchik & Maathuis, 2007), el NSCC puede mediar la entrada de  $\text{Na}^+$  en las plantas de Chile (Rubio *et al.*, 2003). A diferencia de los halófitos, el  $\text{Na}^+$  no es un elemento esencial para la mayoría de las plantas y se vuelve altamente tóxico a altas concentraciones, particularmente en las partes aéreas de la planta. Por lo tanto, es necesario mantener un control eficiente del contenido de  $\text{Na}^+$  y la compartimentación intracelular en los tejidos vegetales. Para ello, los transportadores de potasio de alta afinidad (HKT), los antiportadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1 (Salt Overly Sensitive) en la membrana plasmática y los antiportadores intracelulares de  $\text{NHX}$  ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) son los transportadores involucrados en la homeostasis de  $\text{Na}^+$  (Almeida *et al.*, 2013; Adams & Shin, 2014). La regulación de la homeostasis de  $\text{K}^+$  es esencial para la adaptación de la planta al estrés biótico y abiótico. Las plantas tienen la capacidad de controlar el transporte y la distribución de  $\text{Na}^+$  a los órganos, tejidos y células donde causa menos daño para proteger contra la acumulación de este catión. Sin embargo, las glucófitas más sensibles (cereales o vegetales) no pueden controlar el transporte de  $\text{Na}^+$ ; por lo que, grandes cantidades de este ion se translocan al brote (Maathuis, 2014), lo que inducen senescencia, inhibición del crecimiento y muerte de la planta (Roy *et al.*, 2014). En contraste, la mayoría de las plantas halófitas y algunas glucófitas tienden a acumular grandes cantidades de  $\text{Na}^+$  en las hojas. Se ha sugerido que estas plantas usan  $\text{Na}^+$  además de  $\text{K}^+$  para mantener la turgencia y el crecimiento (Hariadi *et al.*, 2011; Adolf *et al.*, 2013; Bonales-Alatorre *et al.*, 2013a, b; Maathuis, 2014). Bojórquez-Quintal *et al.*, estudiaron dos variedades de Chile habanero (*C. chinense*) los cuales exhibieron el mismo contenido de  $\text{Na}^+$  en las hojas, pero tuvieron diferencias en la acumulación de  $\text{Na}^+$  en raíces (después de un mínimo de siete días de exposición al  $\text{NaCl}$  150 mM) (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014). Por otro lado, en plantas de *C. annuum* tratadas con  $\text{NaCl}$  (100 mM), se ha informado un mayor contenido de  $\text{Na}^+$  en los brotes de genotipos sensibles en comparación con los genotipos tolerantes. De hecho, se observó

una correlación positiva entre la gravedad de los síntomas en las hojas y las concentraciones de  $\text{Na}^+$  en los brotes (Aktas *et al.*, 2006).

Estos mecanismos también se indicaron en tomates y papas (Queirós *et al.*, 2009; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2014). La eficiencia y la alimentación de la absorción de agua y nutrientes están determinadas en gran medida por la expansión del sistema radicular, la arquitectura y la morfología de la raíz. Sin embargo, el exceso de salinidad afecta estos procesos radiculares de manera diferente (Bernstein & Kafkafi, 2002); reducen la germinación, la emergencia de plántulas, incluso el establecimiento del cultivo (Ashraf y Foolad, 2005; Guma *et al.*, 2010; Jamila *et al.*, 2010; Zivdar *et al.*, 2011; Gyawali *et al.*, 2019). En especies de glucófitas, una identificación rápida y simple de fenotipos con fuerte tolerancia a la sal es esencial para el descubrimiento de mecanismos de tolerancia y de genes candidatos asociados con estos mecanismos (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2016).

### **3.6 CONCLUSIONES**

La salinidad reduce el crecimiento de la raíz principal, número de raíces laterales y peso fresco en plántulas de chile habanero criollo y siete caldos.

De las dos especies evaluadas, habanero criollo fue más sensible a la salinidad por NaCl, con los valores mínimos en el crecimiento diario e inhibición de la raíz principal, número de raíces laterales por planta y peso fresco.

El efecto de la salinidad en las raíces de las plantas fue dependiente de la especie de la planta, el tiempo de exposición a la sal y la concentración.

## CAPÍTULO IV

### **Efecto de *Trichoderma asperellum* sobre las variables de crecimiento de plantas de chile (*Capsicum* spp.) bajo estrés salino inducido por NaCl**

#### **4.1 INTRODUCCIÓN**

Al igual que muchas otras hortalizas, el chile (*Capsicum* spp.) se considera un cultivo sensible o moderadamente sensible a la sal; por lo que sus rendimientos se ven reducidos, particularmente por la salinidad causado por el cloruro de sodio (NaCl) (Subramanyam *et al.*, 2011; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014). Con la finalidad de disminuir los efectos negativos que el estrés salino causa a los cultivos de interés agronómico, se han implementado estrategias de control biológico, como el uso de hongos benéficos. Se ha visto que la estrecha relación entre hongo y planta hospedera es de gran importancia ya que el hongo es capaz de producir metabolitos bioactivos, así como modificar los mecanismos de defensa de la planta, lo que les permite la sobrevivencia de ambos organismos (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). El género *Trichoderma* es un grupo de microorganismos rizosféricos con efectos benéficos sobre las plantas, son hongos saprófitos que habitan en todo tipo de suelos y otros hábitats naturales (Siddiquee *et al.*, 2010). En la actualidad, se utilizan como inoculantes para el biocontrol, la biofertilización y la fitoestimulación, gracias a su capacidad para producir compuestos bioactivos y generadores que interactúan con las raíces de la planta hospedera, lo que aumenta directamente el potencial de su crecimiento de la planta y su tolerancia a estrés abiótico (Hidangmayum & Dwivedi, 2018). La planta colonizada con *Trichoderma* produce ciertos compuestos (auxinas, etileno, giberelinas, enzimas vegetales, antioxidantes, fitoalexinas y fenoles), que brindan tolerancia al estrés abiótico y mejoran la capacidad de ramificación del sistema de raíces (Brotman *et al.*, 2013; Lopez-Bucio *et al.*, 2015). Por esto este género es atractivo para explorar su aplicación en zonas climáticas adversas. Con base a lo anterior, en este estudio se planteó como objetivo determinar si *Trichoderma asperellum* (Ta 13-17) puede mejorar la tolerancia a la salinidad en plantas de chile (*C. chinense*, *C. frutescens* y *C. annuum*) y si causa un efecto bioestimulante de crecimiento.



## 4.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Plántulas de *Capsicum* spp. fueron sometidas a estrés salino inducido por NaCl bajo condiciones de invernadero. (Fig. 13).

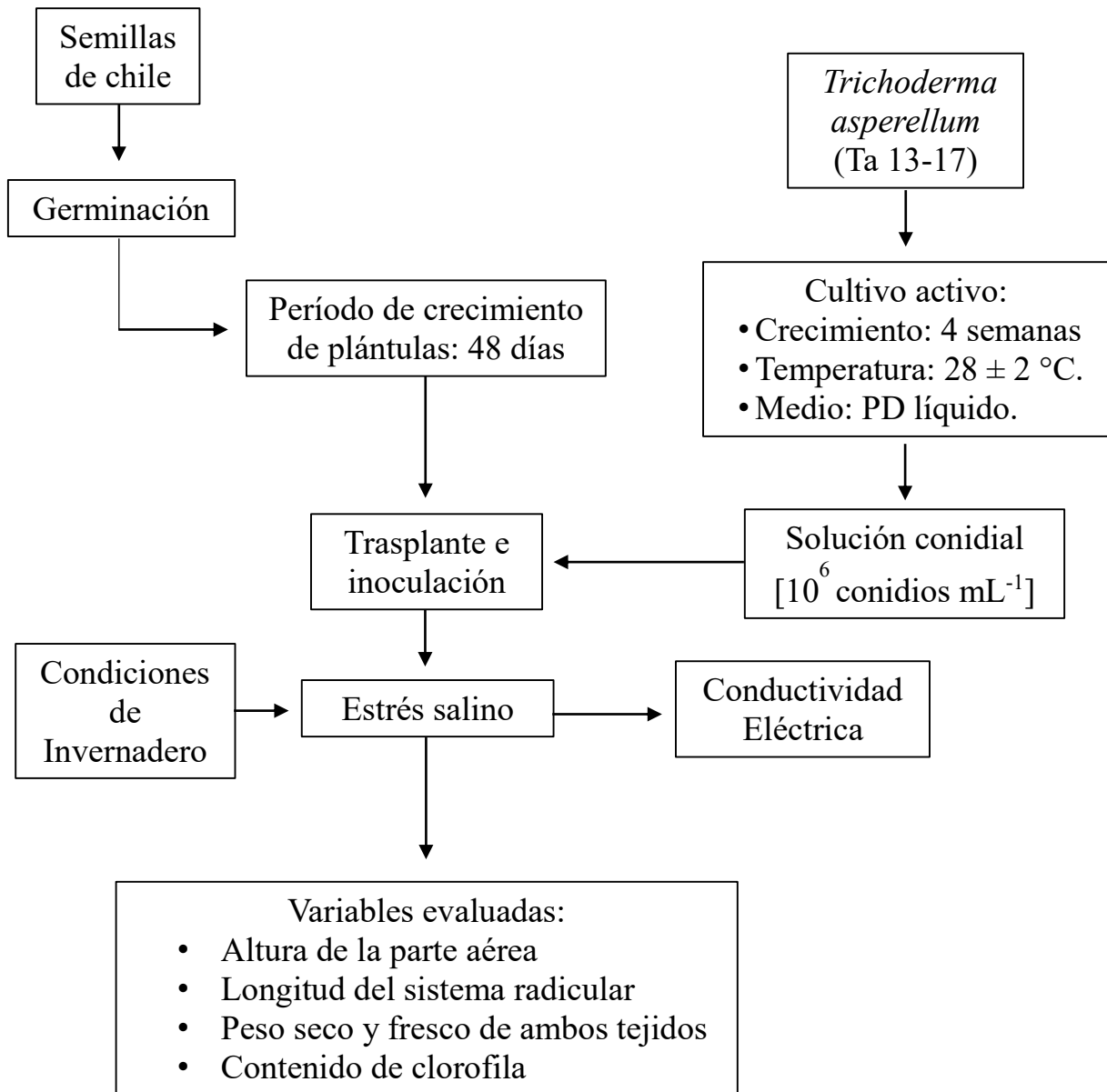


Figura 13. Estrategia experimental para determinar el efecto de *T. asperellum* sobre plantas de chile bajo estrés salino por NaCl

## 4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.3.1. Preparación de inóculo de *Trichoderma asperellum*

Para la suspensión de conidios se inoculó un disco de micelio de *T. asperellum* (Ta 13-17; ver Capítulo II apartado 2.3.2.) en matraces de 250 mL, se incubó a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 15 días. Posteriormente, se filtró asépticamente la suspensión a través de varias capas de gasa estéril, el volumen obtenido se ajustó a la concentración de  $10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  (Azarmi *et al.*, 2011).

### 4.3.2. Material vegetal

Para la obtención de plántulas, se utilizaron semillas de chile siete caldos (*C. frutescens*), habanero criollo (*C. chinense*) colectadas en la localidad de la Trinitaria (Chiapas) (ver Capítulo II, 3.3.1) y en Conkal Yucatán, respectivamente; y jalapeño (*C. annuum*); (Starseeds<sup>®</sup> International Inc.). La germinación se llevó a cabo en charolas de poliestireno expandido con 200 cavidades utilizando Peat moss<sup>®</sup> como sustrato. El riego se realizó con un fertilizante comercial (Ultrasol Multipropósito<sup>®</sup> 18-18-18).

### 4.3.3. Trasplante e inoculación

Plantas con 35 días después de la emergencia fueron trasplantadas en recipientes de poliestireno con capacidad para 730 g con una mezcla de suelo y sustrato orgánico a base de turba (Peat moss<sup>®</sup>) (3:1 v/v). La inoculación se llevó a cabo en el sustrato al trasplante de las plántulas, se aplicaron 15 mL de una suspensión de  $10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  del inoculante fúngico.

#### 4.3.4. Aplicación de tratamientos de estrés salino.

El experimento se llevó a cabo en condiciones de invernadero con una simulación de estrés salino con NaCl. Se evaluaron dos concentraciones 0 y 150 mM de NaCl, disueltas junto con el fertilizante Ultrasol 18-18-18; el volumen de riego fue de 150 mL y se calculó con base a la capacidad de campo del sustrato. La capacidad de campo (CC) se calculó gravimétricamente (Luna-Flores *et al.*, 2012), se seleccionaron cinco recipientes con 730 g de la mezcla de sustrato seco, los cuales fueron regadas en exceso y se dejó drenar libremente por 24 h, se midió el volumen del drenado y se ajustó a la humedad requerida (20%) según el tipo de suelo. Se evaluaron cuatro tratamientos indicados en el cuadro 16:

**Cuadro 16. Tratamientos aplicados en *Capsicum* spp.**

<b>Control</b>	Sin <i>T. asperellum</i> (Ta 13-17) y sin NaCL
<b>Tricho</b>	<i>T. asperellum</i> (Ta 13-17) [ $10^6$ conidios mL <sup>-1</sup> ]
<b>NaCl</b>	150 mM NaCL
<b>Tricho + NaCl</b>	<i>T. asperellum</i> (Ta 13-17) [ $10^6$ conidios mL <sup>-1</sup> ] + 150 mM NaCl.

La aplicación de los tratamientos inició 10 días después de la inoculación con *T. asperellum* para asegura la colonización del microorganismo en el sistema radicular. Se inició con una concentración de 75 mM de NaCl para evitar un desajuste osmótico, dos días después se aplicó 150 mM (concentración final) y así cada segundo día durante 40 días. Se determinó la conductividad eléctrica (CE) al inicio y al finalizar el experimento para asegurar que las plantas estuvieran bajo condiciones de estrés.

#### 4.3.6. Evaluación de las variables de crecimiento

Al finalizar el experimento (después de 23 aplicaciones con un riego salino) se determinaron las siguientes variables de crecimiento: altura de parte aérea (APA) y longitud de raíz (LR) las cuales se midieron manualmente por escala (100 cm). El peso seco de parte aérea

(PSPA) y del sistema radicular (PSR) se determinó mediante secado en una estufa a 60° C durante 96 h. De igual manera, se determinó el contenido de clorofila (CLO) mediante un clorofilómetro Minolta SPAD 502.

#### **4.3.7. Diseño experimental**

El diseño experimental fue completamente al azar con diez repeticiones, los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de medias por el método de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) para separar diferencias entre tratamientos, con ayuda del software SigmaPlot 12.

#### 4.4 RESULTADOS

Durante el riego salino (150 mM de NaCl) que duró 23 días, se observaron síntomas por el exceso de NaCl como clorosis y necrosis (Fig. 14) en algunas hojas, estos se acentuaron en el cultivar de habanero criollo, no obstante, el efecto más evidente fue la reducción del crecimiento de las plantas (Fig. 20). El síntoma causado en las hojas fue poco visible.



**Figura 14. Síntomas relacionados con el estrés salino en plantas de *Capsicum* spp.**

En general en las tres especies de *Capsicum* la salinidad por NaCl disminuyó los parámetros de crecimiento evaluados en comparación con el control, a excepción del contenido de clorofila. La presencia de *T. asperellum* (Ta 13-17) en las plantas sin sal no mostró diferencias con las plantas control (Fig. 15, 16, 17, 18 Y 19).

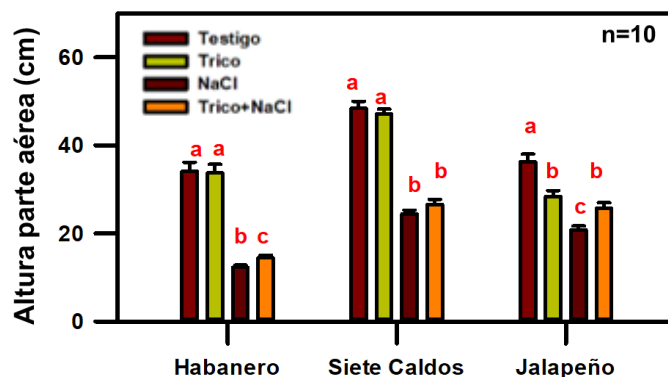


Figura 15. Efecto de *T. asperellum* en la altura de la parte aérea en plantas de *Capsicum* spp. expuestas a estrés salino por NaCl.

La inoculación de *T. asperellum* (Ta 13-17) en plantas estresadas aumentó significativamente ( $P \leq 0.01$ ) la altura de la parte aérea en las plantas de habanero criollo y jalapeño, sobre aquellas plantas estresadas no inoculadas (Fig 15). Este efecto benéfico, se repitió en las plantas de habanero criollo estresadas en el incremento significativo de la longitud del sistema radicular (Fig. 16).

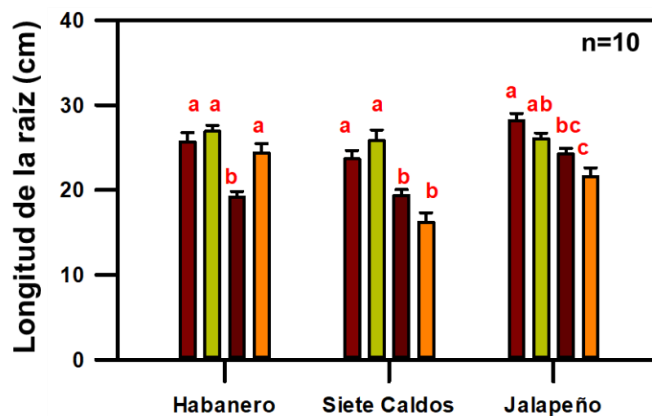


Figura 16. Efecto de *T. asperellum* en la longitud de la raíz en plantas de *Capsicum* spp. expuestas a estrés salino por NaCl. Tratamientos: — Control: Sin *T. asperellum* (Ta 13-17) y sin sal, — Tricho: *T. asperellum* (Ta 13-17) [ $1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>], — NaCl: 150 mM y — Tricho + NaCl: 150 mM NaCl + *T. asperellum* (Ta 13-17) [ $1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>].

Las plantas de habanero criollo y siete caldos tuvieron un incremento en el peso seco de la parte aérea cuando crecieron en presencia de *T. asperellum* (Ta 13-17) y estuvieron expuestas a estrés salino, en comparación con aquellas plantas estresadas sin el hongo (Fig. 17).

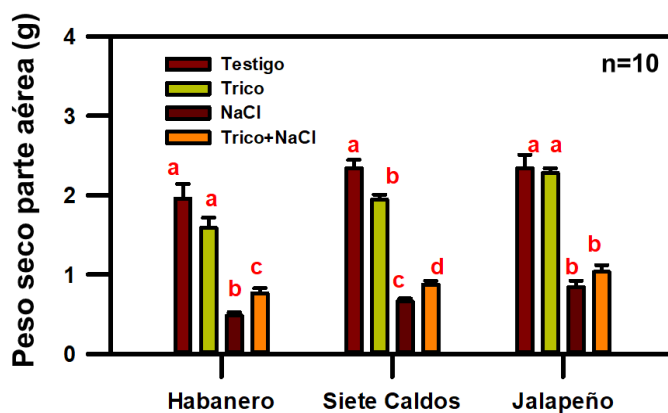


Figura 17. Efecto de *T. asperellum* en el peso seco de la parte aérea en plantas de *Capsicum* spp. expuestas a estrés salino por NaCl.

El peso seco de raíz también experimentó un aumento con la inoculación de *T. asperellum* (Ta 13-17) en las plantas estresadas de chile habanero (Figura 18).

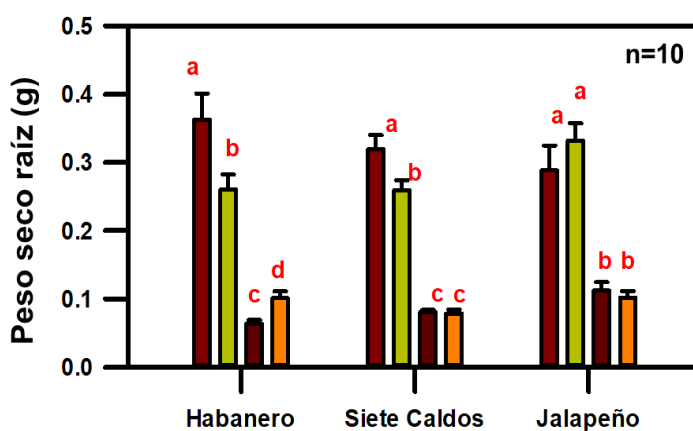
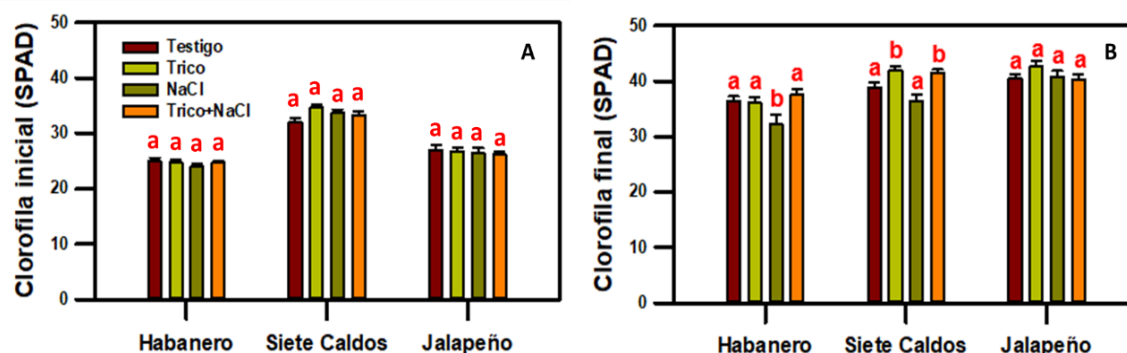


Figura 18. Efecto de *T. asperellum* en el peso seco de la raíz en plantas de *Capsicum* spp. expuestas a estrés salino por NaCl. Tratamientos: — Control: Sin *T. asperellum* (Ta 13-17) y sin sal, — Tricho: *T. asperellum* (Ta 13-17) [ $1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>], — NaCl: 150 mM y — Tricho + NaCl: 150 mM NaCl + *T. asperellum* (Ta 13-17) [ $1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>].

El contenido de clorofila se evaluó al inicio y final del experimento, las plantas inicialmente no presentaron diferencias en el contenido de clorofila. Sin embargo, éste se redujo significativamente cuando las plantas de habanero no inoculadas con el hongo se expusieron a la salinidad (Fig. 19). Sin embargo, en presencia de *Trichoderma* se presentó un aumento significativo ( $P \leq 0.01$ ) de éste parámetro, por lo que *T. asperellum* (Ta 13-17) mejoró el contenido de clorofila bajo condiciones de estrés.



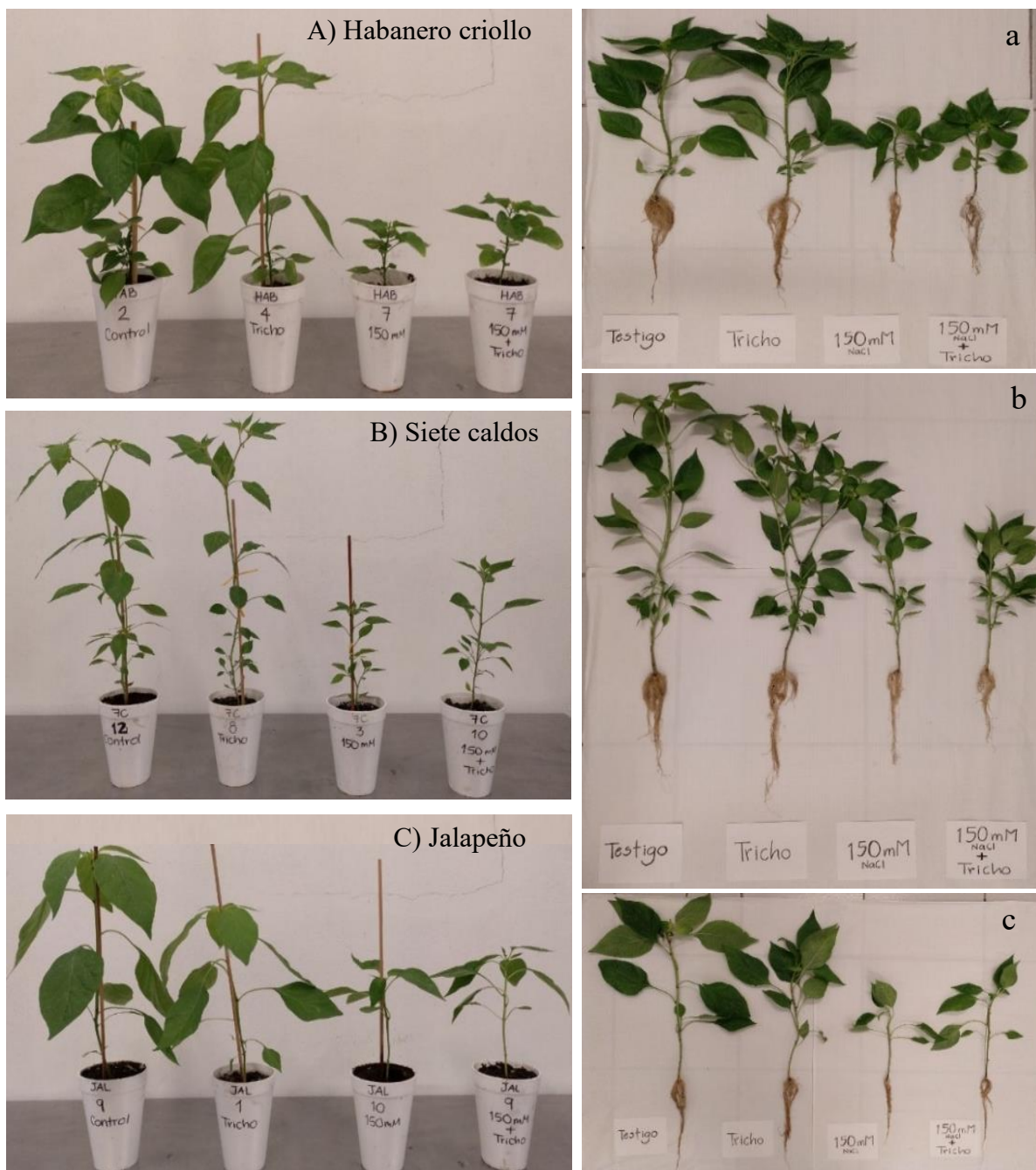
**Figura 19. Efecto de *T. asperellum* sobre el contenido de clorofila en plantas de *Capsicum* spp. expuestas a estrés salino por NaCl.**

Los resultados mostrados indicaron que la aplicación de *T. asperellum* (Ta 13-17) en plantas de habanero criollo expuestas a NaCl, favorece el crecimiento. Mientras que, en las otras dos especies únicamente se mejoró la altura de la parte aérea en chile jalapeño; y el peso seco de parte aérea y el contenido de clorofila en siete caldos (Cuadro 17, Fig. 20).

**Cuadro 17. Efecto benéfico de *T. asperellum* (Ta 13-17) en plantas de *Capsicum* spp. expuestas a NaCl.**

Parámetros	Habanero criollo ( <i>C. chinense</i> )	Siete caldos ( <i>C. frutescens</i> )	Jalapeño ( <i>C. annum</i> )
A PA	√		√
L R	√		
PS PA	√	√	
PS R	√		
CLO	√	√	





**Figura 20. Diferencias morfológicas, sensibilidad al estrés salino y a la aplicación de *T. asperellum* (Ta 13-17) en las plantas de *Capsicum* spp. Tratamientos de izq. a der.: Control, Tricho, NaCl y Tricho+NaCl.**

## 4.5 DISCUSIÓN

En el mundo, el estrés por salinidad afecta negativamente el crecimiento y el rendimiento de varias plantas de cultivo. Recientemente, se ha visto que la inoculación con cepas específicas de *Trichoderma* reduce o ayuda a las plantas a sobrevivir en condiciones de estrés salino; la mejora significativa del crecimiento de las plantas ha sido demostrado en varios estudios de cultivos agrícolas como trigo (Rawat *et al.*, 2011), tomate (Mastouri *et al.*, 2012), garbanzo (Rawat *et al.*, 2013), frijol (Hashem *et al.*, 2014), mostaza (Ahmad *et al.*, 2016), maíz (Kumar *et al.*, 2017b) y pepino (Zhang *et al.*, 2019). El presente estudio demostró el efecto de *T. asperellum* (Ta 13-17) bajo condiciones de estrés salino en tres variedades de chile (*Capsicum* spp.), así como, la respuesta diferencial de las plantas de chile ante este tipo de estrés y la presencia del hongo. Como consecuencia de la exposición a 150 mM de NaCl, el crecimiento de las plantas y la acumulación de materia seca se redujo (tratamientos NaCl) en las tres variedades de chile. El estrés por salinidad induce estrés osmótico e iónico que conduce a un crecimiento retardado en términos de longitud del tallo y raíz, peso fresco y seco, contenido de pigmento reducido y obstaculiza la absorción de elementos minerales (Ahmad *et al.*, 2014; Hessini *et al.*, 2015; Abbas *et al.*, 2015). La disminución en su capacidad para absorción de nutrientes y agua, es debido al estrés hídrico temprano (en este caso impuesto por salinidad) que restringe el crecimiento y desarrollo del área foliar, lo que afecta la producción de biomasa total de la planta (Batista-Sánchez *et al.*, 2019). La acumulación de sodio altera los procesos fisiológicos y bioquímicos, como fotosíntesis, respiración, funciones de la membrana, entre otros (Ahmad *et al.*, 2016). En un estudio, conforme aumentaron las concentraciones de NaCl se evidenció una disminución en la biomasa fresca de la parte aérea en plántulas de dos variedades de albahaca (Napoletano y Emily) (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018). En el presente estudio, la suplementación de las plantas estresadas con la inoculación de *T. asperellum* (Ta 13-17) mostró un efecto benéfico, aunque diferente según la variable de crecimiento y la especie de chile.

La altura de la planta es resultado de la asimilación de nutrientes y de sus procesos de división y elongación celular. Una respuesta favorable en condiciones de estrés por salinidad demuestra tolerancia de la planta ante una interferencia en la nutrición mineral, toxicidad iónica,

y daños en su aparato fotosintético (Paellob, 2010). Tal fue el caso de las plantas de chile siete caldos en este estudio, la aplicación de *T. asperellum* (Ta 13-17) no tuvo diferencias significativas en comparación con la ausencia de éste. Cuando las plantas se sometieron a estrés salino el comportamiento fue similar lo que sugirió que éstas utilizan mecanismos propios de tolerancia a la salinidad. Caso contrario, a lo ocurrido con las plantas de chile habanero criollo y jalapeño, que la inoculación con *T. asperellum* (Ta 13-17) aumentó la altura de la parte aérea de las plantas bajo estrés salino. Uno de los puntos benéficos de *Trichoderma* es la promoción del crecimiento de las plantas (Shukla *et al.* 2012). Se ha reportado un aumento significativo en la altura (28%) y el peso (8%) de las plantas de tomate enanas cultivadas en condiciones estériles después del tratamiento con *T. viride* (Lindsey & Baker 1967). En el caso de los cultivares de chile Merlin Belle, Vanguard Belle y Bonanza, las aplicaciones de *Trichoderma* T-22 en el producto comercial RootShield aumentaron significativamente los rendimientos (5.9, 3.6 y 5.4 kg frente a 10.2, 8.6 y 9.6 kg, respectivamente (Harman, 2000). En campo con maíz blanco, las plantas tratadas con *Trichoderma* fueron más robustas y más verdes, probablemente como resultado de una mayor eficiencia en el uso de nitrógeno (Harman, 2011). La señalización de nitrógeno se cruza con otras redes de señalización para controlar el crecimiento y desarrollo de la planta. Con la inoculación de *T. asperelloides* T203 se aumentó el contenido de aminoácidos en las plantas colonizadas (Brotman *et al.*, 2012). La capacidad de asignar y posteriormente reutilizar nitrógeno, junto con la absorción de nitrógeno, es el principal determinante de la eficiencia del uso de nitrógeno. Así, el aumento del nivel de varios aminoácidos cuando se inoculan con *Trichoderma* spp. podría ser uno de los determinantes del aumento de la eficiencia del uso de nitrógeno, ya que los aminoácidos son la forma principal de nitrógeno transportado.

El peso seco de la parte aérea de las plantas estresadas de chile jalapeño (*C. annuum*) no mostraron diferencias ante la inoculación de *T. asperellum* (Ta 13-17). En otro estudio, se evaluó el peso fresco de *C. annuum* de brotes en presencia de estrés salino. Los resultados mostraron que la sal 150 mM no tuvo un impacto negativo en el peso de la planta en comparación con las plantas control (0% NaCl), mientras que los pesos de las plantas disminuyeron en un mayor contenido de NaCl (300 mM) (He *et al.*, 2018). El resultado de este estudio permite suponer que a esta variedad de chile jalapeño no le afecta la concentración de 150 mM de NaCl. Por otro lado, se ha comprobado que la adición de *Trichoderma* spp. favorece la producción de biomasa

en los cultivos; en plantas de pepino inoculadas con *T. harzianum* mostraron una ganancia en la biomasa total en condiciones salinas en relación con plantas no inoculadas (Huang *et al.*, 2011). La inoculación con aislados de *Trichoderma* también aumentó el peso fresco y seco de la raíz y el brote (Mayak *et al.*, 2004). Esto coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, para las plantas de chile habanero criollo (*C. chinense*) y siete caldos (*C. frutescens*), la adición de *T. asperellum* (Ta 13-17) tuvo un efecto benéfico (tratamiento Tricho + NaCl), sobre aquellos tratamientos salinos sin la presencia del hongo.

Los resultados que se obtuvieron sobre el aumento en la longitud y peso seco de la raíz gracias al efecto benéfico de *T. asperellum* (Ta 13-17) en las plantas de chile habanero criollo bajo un estrés salino, se reportó en tomate con la aplicación de *Trichoderma* spp. donde observaron las raíces profundas, lo que mejoró la adquisición de agua y absorción de nutrientes y mayor capacidad de las plantas para resistir el estrés abiótico (Azarmi *et al.*, 2011). Las raíces asociadas con estos hongos con frecuencia son más vigorosas y robustas, como se evidenció en plantas de soya en las que se obtuvo un aumento del rendimiento del 123% cuando se inoculó con *Trichoderma* T-22 (Harman, 2000). También con *T. longipile* y *T. tomentosum* aumentaron el área foliar (58–71%), el peso seco del brote (91–102%) y el peso seco de la raíz (100–158%) de las plántulas de repollo (Rabeendran *et al.*, 2000). Por otro lado, la suplementación de *Trichoderma* en plántulas de mostaza tratadas con NaCl mostró una elevación de 13.8, 11.8 y 16.7% en el brote, la longitud de la raíz y el peso seco de la planta, respectivamente, en comparación con las plantas tratadas solo con NaCl (200 mM) (Admad *et al.*, 2016). Ji *et al.* (2017) y Zhang *et al.* (2019) mostraron con *T. harzianum* un incremento en los pesos frescos y secos de pepino, además mejoraron el crecimiento de la planta, altura y tamaño de hoja, así mismo, se promovió el desarrollo de la raíz. La ramificación de raíz es uno de los efectos más informados de *Trichoderma* spp. (Contreras-Cornejo *et al.*, 2013; Contreras-Cornejo *et al.*, 2014). Se ha reportado que el uso de aislados de *Trichoderma* en plantas aumenta la longitud de la raíz y las raíces secundarias, lo que ayuda a una alta adquisición y mejor capacidad de las plantas para resistir el estrés salino (Arora *et al.*, 1992).

Uno de los mecanismos que se argumenta con mayor frecuencia para explicar los efectos de *Trichoderma* en el crecimiento de las plantas es la producción de hormonas vegetales, especialmente auxinas (Contreras-Cornejo *et al.* 2009, 2015a, b). El crecimiento de las plantas

también es estimulado por microorganismos que producen ACC desaminasa (ACCD), que escinde ACC, precursor inmediato de ET, para producir  $\alpha$ -cetobutirato y amoníaco (Todorovic & Glick, 2008). *T. asperellum* T203 posee un gen que codifica un ACCD que participa en el alargamiento de la raíz de las plantas de colza (Viterbo *et al.*, 2010). Recientemente se informó que *T. atroviride* produce ET y que sus niveles aumentaron cuando la cepa se cultivó en presencia de L-metionina. *A. thaliana* inoculada con *T. atroviride* formó varios pelos radiculares y raíces laterales (Contreras-Cornejo *et al.*, 2015b). Las plantas inoculadas con cepas de *Trichoderma* han mostrado un aumento de los compuestos relacionados con la defensa y el estrés como JA, SA y ABA (Martínez-Medina *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2014). Se sabe que SA está involucrado en la activación de antioxidantes contra diferentes tensiones ambientales como calor, NaCl, UV, metales pesados, entre otros (Mishra & Choudhuri, 1999; Ahmad *et al.*, 2011). También *Trichoderma* además de producir hormonas de crecimiento de las plantas, sintetizan 1-aminociclopropano-1-carboxilato de desaminasa (ACC), que escinde ACC, precursor inmediato de la fitohormona etileno y confiere “tolerancia sistémica inducida” (TSI) contra sequía y estrés salino (Viterbo *et al.*, 2010). El aumento en la longitud de la raíz probablemente se debe a la disponibilidad de IAA. Kumar *et al.* (2017a) en un estudio *in vitro* en presencia de *L-tryptophan*, encontraron que de 70 aislados de *Trichoderma* spp. la cepa TRC3 confirió mayor longitud de raíz en maíz en comparación con los otros aislamientos, debido a la producción de ácido indol acético (36.6 mg ml<sup>-1</sup>). En bioensayos en invernadero, el AIA exógeno, como el producido por microorganismos, causa cambios en la morfología de la raíz el cual se ve influenciado en la toma de nutrientes (Arteca, 1996). Según Kamilova *et al.* (2006), la mayor parte de la auxina encontrada en la rizosfera de forma natural, es derivada del triptófano secretado por la raíz y convertida en auxina por bacterias y hongos. Por lo tanto, el AIA incluso el producido por microorganismos, puede influir en el crecimiento de la raíz dependiendo de la cantidad encontrada en la rizosfera a través de la elongación y formación de raíces laterales o adventicias (Taiz & Zeiger, 2010; Gravel *et al.*, 2010). *Trichoderma* spp. produce auxinas capaces de estimular el crecimiento de la planta y desarrollo de la raíz (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Ortuño *et al.*, 2013).

El estrés por NaCl inhibe los pigmentos fotosintéticos en la mayoría de las especies de plantas. En este estudio, se observó la disminución del contenido de clorofila en las plantas de chile habanero y siete caldos bajo estrés salino y se demostró como la inoculación de *T. asperellum* (Ta 13-17) aumentó esta variable en plantas estresadas comparadas con aquellas plantas estresadas sin la presencia del inoculante fúngico. La disminución del contenido de clorofila podría explicarse de la siguiente manera: (i) inhibición de la síntesis de enzimas importantes, como la deshidratasa del ácido  $\delta$ -aminolevulínico y la reductasa de protoclorofilida, que están involucradas en la biosíntesis de clorofila y (ii) deterioro en el suministro de  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  que se requieren para la síntesis de clorofila (Padmaja *et al.*, 1990; Van Assche & Clijsters, 1990; Küpper *et al.*, 1996). La aplicación de *T. asperellum* (Ta 13-17) restauró el contenido de clorofila a un nivel apreciable en el presente estudio y los resultados se corroboran con los hallazgos de Rawat *et al.* (2011), Zhang *et al.* (2013) y Ahmad *et al.* (2015). Se ha visto que, *Trichoderma* spp. aumenta la absorción de elementos esenciales, especialmente  $Mg^{2+}$ , elemento que es afectado negativamente por el estrés de NaCl, por lo que, la síntesis de clorofila aumenta en las plantas inoculadas con *Trichoderma* (Martínez-Medina *et al.*, 2014). Otra razón para aumentar el contenido de pigmento en las plantas está asociada con la producción de fitohormonas que contribuyen a la estimulación del contenido de clorofila (Resende *et al.*, 2014). El aumento de los pigmentos fotosintéticos por la colonización de *Trichoderma* también está relacionada con la inhibición de la absorción de Na (Iqbal & Ashraf, 2013). La eficiencia fotosintética en las plantas depende de los pigmentos fotosintéticos, como la clorofila a y b. Estos pigmentos juegan un papel importante en las reacciones fotoquímicas durante la fotosíntesis (Olaiya & Poloamina, 2013). *Trichoderma* tiene un papel importante en los procesos metabólicos de las plantas hospederas, este grupo particular de hongos induce tolerancia al estrés el desarrollo mejorado de raíces y brotes, resistencia sistémica inducida, inactivación de enzimas patógenas, solubilización, secuestro de nutrientes inorgánicos (Scala *et al.*, 2007; Pill *et al.*, 2009; Singh, 2014; Bisen *et al.*, 2016), eficiencia del uso de nitrógeno (Harman *et al.*, 2004a; Shores *et al.*, 2010), inducción de la protección mediante osmolitos, absorción de minerales esenciales y mejora la eficiencia fotosintética (Hashem *et al.*, 2014). Con base a informes químicos y analíticos, estos hongos son productores prolíficos de metabolitos secundarios (peptaibols, NRP, terpenos volátiles y no volátiles, pironas, sideróforos

y compuestos que contienen nitrógeno), se han identificado 373 moléculas, pero en muchos casos la actividad específica se desconoce (Reino *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2012a, Mukherjee *et al.*, 2012b; Crutcher *et al.*, 2013).

En este estudio el efecto de *T. asperellum* (Ta 13-17) sobre plantas sometidas a un estrés salino fueron diferentes para cada especie, esto demuestra la especificidad del cultivo y, por lo tanto, es un área que se necesita explorar en el futuro. Estas diferencias se presentan entre distintas variedades de la misma especie, que reaccionan de manera particular a estímulos causados por factores bióticos y abióticos (Rodríguez-Álvarez, 2020). El chile, es una de las hortalizas tradicionales de mayor uso en el mundo, y se ha reportado que tiene poca tolerancia al estrés por sal (Ali *et al.* 2017; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2016). Sin embargo, la tolerancia a la sal depende de muchos factores; etapa de crecimiento de las plantas, tipo de planta, clima y tipo de sal (Shannon & Grieve, 1998; Ayers & Westcot, 1985), propiedades del suelo (Maas, 1990), temperatura de la zona radicular (Dalton *et al.*, 1997), concentración de CO<sub>2</sub> en el aire (Maggio *et al.*, 2002), prácticas culturales (por ejemplo, fracción de lixiviación), entre otros.

#### 4.6 CONCLUSIONES

La salinidad reduce las variables morfométricas de crecimiento en las tres especies evaluadas, la especie más sensible fue *Capsicum chinense* (chile habanero criollo).

*Trichoderma asperellum* (Ta 13-17) contribuyó a mitigar el estrés por salinidad en plantas de chile habanero criollo.

La variabilidad en las respuestas de las plantas dependió de la especie de chile.



## REFERENCIAS

- Abbas, G., Saqib, M., Akhtar, J., Haq, M. A. U. (2015). Interactive effects of salinity and iron deficiency on different rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178(2), 306-311.
- Adams E., Shin, R. (2014). Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 56, 231-249.
- Adolf, V.I., Jacobsen, S.E., Shabala, S. (2013). Salt tolerance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Environmental and Experimental Botany* 92, 43-54.
- Ahmad, P., Abdel Latef, A. A., Hashem, A., Abd\_Allah, E. F., Gucel, S., Tran, L. S. P. (2016). Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 7, 347.
- Ahmad, P., Hashem, A., Abd-Allah, E.F., Alqarawi, A.A., John, R., Egamberdieva, D., Gucel S. (2015). Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) through antioxidative defense system. *Front. Plant Sci.* 6:868.
- Ahmad, P., Nabi, G. & Ashraf, M. (2011). Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. *S. Afr. J. Bot.* 77, 36–44. doi: 10.1016/j.sajb.2010. 05.003.
- Ahmad, P., Ozturk, M., Sharma, S. & Gucel, S. (2014). Effect of sodium carbonate-induced salinity-alkalinity on some key osmoprotectants, protein profile, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in two mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *J. Plant Interact.* 9, 460–467. doi: 10.1080/17429145.2013.855271.
- Ahmadi, FI; Karimi, K.; Struik, PC. (2018). Effect of exogenous application of methyl jasmonate on physiological and biochemical characteristics of *Brassica napus* L. cv. Talaye under salinity stress. *S. Afr. J. Bot.*, 115, 5–11.
- Aktas H., Abak, K., Cakmak, I. (2006). Genotypic variation in the response of pepper to salinity. *Scientia Horticulturae* 110, 260-266.
- Ali, S., Rizwan, M., Qayyum, M. F., Ok, Y. S., Ibrahim, M., Riaz, M., Shahzad, A. N. (2017). Biochar soil amendment on alleviation of drought and salt stress in plants: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(14), 12700-12712.

- Almeida P., Katsching, D., de Boer, A.H. (2013). HKT Transporters-State of the art. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 20359-20385.
- Almeida, P., de Boer, G.-J., de Boer, A. H. (2014). Differences in shoot Na<sup>+</sup> accumulation between two tomato species are due to differences in ion affinity of HKT1;2. *J. Plant Physiol.* 171, 438-447. doi: 10.1016/j.jplph.2013.12.001.
- Alqarawi AA, Hashem A, Abd Allah EF, Alshahrani TS, Huqail AA. (2014). Effect of salinity on moisture content, pigment system, and lipid composition in *Ephedra alata* Decne. *Acta Biol Hung.* 65(1): 61-71.
- Anthony, A. (1998). Biología molecular de la tolerancia a la sal en el contexto de la fisiología de toda la planta. *J. Exp. Larva del moscardón.*, 49, 915-929.
- Apse M.P., Blumwald E. (2007). Na<sup>+</sup> transport in plants. *FEBS Letters* 581, 2247-2254.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science* 20;285(5431):1256-8.
- Arora, D.K., Elander, R.P., Mukherji, K.G., (1992). *Fungal Biotechnology. Handbook of Applied Mycology.* Markel Dekker, New York.
- Arteca, R.N. (1996). *Plant Growth Substances: Principles and Applications.* Chapman & Hall, New York. 332 pp.
- Ashraf, M. & Foolad, M.R. (2005). Pre-sowing seed treatment-a shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and nonsaline conditions. *Adv. Agron.* 88: 223–271. doi:10.1016/S0065-2113(05)88006-X.
- Avni, A., Bailey, B. A., Mattoo, A. K., & Anderson, J. D. (1994). Induction of ethylene biosynthesis in *Nicotiana tabacum* by a *Trichoderma viride* xylanase is correlated to the accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase transcripts. *Plant Physiology*, 106(3), 1049-1055.
- Ayers, RS; Westcot, DW. (1985). Calidad del agua para la agricultura. En el Documento 29 de Riego y Drenaje de la FAO (Rev. 1); Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: Roma, Italia.

- Azarmi, R., Hajieghrari, B., & Giglou, A. (2011). Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology*, 10(31), 5850-5855.
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L., & Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of experimental botany*, 60(11), 3279-3295.
- Baez-Rogelio, A., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., & Muñoz-Rojas, J. (2017). Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. *Microbial biotechnology*, 10(1), 19-21.
- Barák, I. (2017). Spores and Spore Formers. *Frontiers in microbiology*, 8, 1046.
- Batista-Sánchez, D., B. Murillo-Amador, A. Nieto-Garibay, L. Alcaráz-Meléndez, E. Troyo-Diéguez, L. Hernández-Montiel, C. M. Ojeda-Silvera, J. M. Mazón-Suástegui y Y. M. Agüero- Fernández. (2019). Biostimulant derived from sugar cane mitigates the effects of NaCl stress in *Ocimum basilicum* L. *Ecosist. Recur. Agropec.* 6: 297-306.
- Baxter A., Mittler, R., Suzuki, N. (2013). ROS as key players in plant stress signaling. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/ert375.
- Benitez, T., Villa, T.G., Garcia-Acha, I. (1976). Some chemical and structural features of the conidial wall of *Trichoderma viride*. *Canadian Journal of Microbiology* 22, 318–321.
- Berg, G., Alavi, M., Schmidt, C. S., Zachow, C., Egamberdieva, D., Kamilova, F. (2013). “Biocontrol and osmoprotection for plants under saline conditions,” in *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, ed. F. J. de Bruijn (Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc.).
- Bernstein, N. & Kafkafi, U. (2002). Root growth under salinity stress. In: Waisel Y, Eshel Y, Kafkafi U (eds) *Plant roots: The hidden half*. Marcel Dekker, New York, pp 787-805.
- Berthomieu P., Conejero, G., Nublat, A., Brackenbury, W.J. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* show that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO Journal* 22, 2004-2014.

- Bethke, P.C. & Drew, M.C. (1992). Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annuum* during progressive exposure to NaCl salinity. *Plant Physiol.* 99, 219–226.
- Betina, V. (1995). Differentiation and secondary metabolism in some prokaryotes and fungi. *Folia Microbiologica* 40, 51–67.
- Bhattacharjee, S. (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Botany*, doi: 10.1155/2012/985298.
- Bisen, K., Keswani, C., Mishra, S., Saxena, A., Rakshit, A., & Singh, H. B. (2015). Unrealized potential of seed biopriming for versatile agriculture. In *Nutrient use efficiency: from basics to advances* (pp. 193-206). Springer, New Delhi.
- Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 431–434.
- Bojórquez-Quintal E., Echevarría-Machado I., Medina-Lara F. & Martínez-Estevez M. (2012). Plants Challenges in a Salinized World: The Case of *Capsicum*: Review. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(72), pp. 13614-13626.
- Bojórquez-Quintal E., Ruiz-Lau N., Velarde-Buen A., EchevarriaMachado I., Pottosin I., Martínez-Estevez M. (2016). Natural variation in primary root growth and K<sup>+</sup> retention in roots of habanero pepper (*Capsicum chinense*) under salt stress. *Funct Plant Biol* 43:1114.
- Bojórquez-Quintal E., Velarde-Buendía A., Ku-González A., Carillo-Pech M, Ortega-Camacho D., Echevarría-Machado I., Pottosin I. & Martínez-Estévez M. (2014). Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): Proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation. *Frontiers in Plant Science* 5: 605, 1-14.
- Bonales-Alatorre, E., Pottosin, I., Shabala, L., Chen, Z. H., Zeng, F., Jacobsen, S. E., & Shabala, S. (2013a). Differential activity of plasma and vacuolar membrane transporters contributes to genotypic differences in salinity tolerance in a halophyte species, *Chenopodium quinoa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9267-9285.

- Bonales-Alatorre, E., Shabala, S., Chen, Z. H., & Pottosin, I. (2013b). Reduced tonoplast fast-activating and slow-activating channel activity is essential for conferring salinity tolerance in a facultative halophyte, quinoa. *Plant Physiology*, 162(2), 940-952.
- Bose J., Shabala, L., Pottosin, I., Zeng, F., Velarde-Buendía, A.M., Massart, A., Poschenrieder, C., Hariadi, Y., Shabala, S. (2014). Kinetics of xylem loading, membrane potential maintenance, and sensitivity of K<sup>+</sup>-permeable channels to reactive oxygen species: physiological traits that differentiate salinity tolerance between pea and barley. *Plant, Cell and Environment* 37, 589-600.
- Bose J., Xie, Y., Shen, W., Shabala, S. (2013). Haem oxygenase modifies salinity tolerance in *Arabidopsis* by controlling K<sup>+</sup> retention via regulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and by altering SOS1 transcript levels in roots. *Journal of Experimental Botany* 64, 471-481.
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., & Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS pathogens*, 9(3).
- Brotman, Y., Lisec, J., Méret, M., Chet, I., Willmitzer, L., Viterbo, A. (2012). Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology*, 158(1), 139-146.
- Cabanero, F.J., Martínez, V., Carvajal, M., (2004). Does calcium determine water uptake under saline conditions in pepper plants, or is it water flux, which determines calcium uptake? *Plant Sci.* 166, 443–450.
- Carvajal, M., Martinez, V., Alcaraz, C.F., (1999). Physiological function of water channels, as affected by salinity in roots of paprika pepper. *Physiol. Plant.* 105, 95–101.
- Cervantes-García, D., Padilla-Ramírez J.S., Simpson, J., Mayek-Pérez, N. (2003). Osmotic potential effects on *in vitro* growth, morphology and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Phytopathology* 151:456-462.
- Chaman M., Veneros R., Araujo E., Ramírez A., Hidalgo J, Luis B., Ramos C. (2014). Contenido de prolina en *Solanum lycopersicum* pretratado con glicina betaina y sometido a estrés salino. *REBIOL*; 34(1): 19-25.

- Chanroj S., Wang G., Venema K., Zhang M.W., Delwiche C.F., Sze, H. (2012). Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporters from algae to flowering plants. *Frontiers in Plant Science*, doi: 10.3389/fpls.2012.00025.
- Cheeseman J.M. (1988). Mechanisms of Salinity Tolerance in Plants: Review. *Plant Physiol.* 87, 547-550.
- Chen Z., Pottosin, I.I., Cuin, T.A., Fuglsang, A.T., Tester, M., Jha, D., Zepeda-Jazo, I., Zhou, M., Palmgren, M.G., Newman, I.A., Shabala S. (2007b). Root plasma membrane transporters controlling K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology* 145, 1714-1725.
- Cimato A, Castelli S, Tattini M, Traversi ML (2010). An ecophysiological analysis of salinity tolerance in olive. *Environ Exp Bot* 68:214-221
- Conn S., Gilliham, M. (2010). Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Annals of Botany* 105, 1081-1102.
- Contreras-Cornejo HA, Ortiz-Castro R, Lopez-Bucio J. (2013) Promotion of plant growth and the induction of systemic defence by *Trichoderma*: Physiology, genetics and gene expression. In: Mukherjee PK (ed.). *Trichoderma* Biology and Applications. London: CABI, 175–96.
- Contreras-Cornejo, H. A., López-Bucio, J. S., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, Á. A., López-Bucio, J. (2015a). Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root-system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(6), 701-710.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(3), 1579-1592.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Herrera-Estrella, A., López-Bucio, J. (2014). The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. *Plant and Soil*, 379(1-2), 261-274.

- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology*, 92(4), fiw036.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Garnica-Vergara, A. (2015b). *Trichoderma* modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism. *J Plant Growth Regul*; 34:425–432.
- Coudert, Y., Perin, C., Courtois, B., Khong, N. G., and Gantet, P. (2010). Genetic control of root development in rice, the model cereal. *Trends Plant Sci.* 15, 219–226.
- Crutcher, F. K., Parich, A., Schuhmacher, R., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Kenerley, C. M. (2013). A putative terpene cyclase, *vir4*, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens*. *Fungal genetics and biology*, 56, 67-77.
- Dalton, FN; Maggio, A.; Piccinni, G. (1997). Efecto de la temperatura de la raíz en las funciones de respuesta de la planta para el tomate: Comparación de los índices de estrés de salinidad estática y dinámica. *Plant Soil*, 192, 307–319.
- Dastogeer, K.M., Li, H., Sivasithamparam, K., Wylie, S.J. (2018). *In vitro* salt and thermal tolerance of fungal endophytes of *Nicotiana* spp. growing in arid regions of north-western Australia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(11-12), 602-616.
- Davenport R.J., Munoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., Tester, M. (2007). The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 30, 497-507.
- Deinlein U., Stephan A.B., Horie T., Luo W., Xu G., Schoeder I. (2014). Plant salt tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*. dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.001.
- Dekoum V.M., Assaha A.U., Hirofumi S., Rashid A., Mahmoud W.Y. (2017). The role of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters in salt stress adaptation in glycophytes. *Frontiers in Physiology* 8: 509. doi: 10.3389/fphys.2017.00509.
- Demidchik, V. & Maathuis, F. J. M. (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signaling and development. *New Phytol.* 175, 387–404. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128. x.

- Demidchik, V. & Tester, M. (2002). Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 128, 379–387.
- Donoso E. P., Bustamante R. O., Carú M., Niemeyer H. M. (2008). El déficit hídrico como impulsor de la relación mutualista entre el hongo *Trichoderma harzianum* y dos genotipos de trigo. *Appl Environ Microbiol* 74: 1412- 1417.
- Duan, L., Dietrich, D., Han Ng, C., Yeen Chan, P.M., Bhalerao, R., Bennett, M.J., Dinneny, J.R. (2013). Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell* 25, 324–341.
- Elabyad, M.S., Hindorf, H., Rizk, M.A. (1988). Impacto del estrés de salinidad en los hongos de la remolacha azucarera transmitidos por el suelo. I. Implicaciones de patogenicidad. *Suelo vegetal.* 110: 27-32.
- Fanelli, F., Liuzzi, V. C., Logrieco, A. F., & Altomare, C. (2018). Genomic characterization of *Trichoderma atrobrunneum* (*T. harzianum* species complex) ITEM 908: insight into the genetic endowment of a multi-target biocontrol strain. *BMC genomics*, 19(1), 662.
- FAO. (2013). El sistema de información global sobre el agua de la FAO - AQUASTAT. Roma, Italia: FAO.
- Farhouni, R. (2011). Effect of Salt Stress on Physiological and Morphological Parameters of Rapeseed Cultivars. *Adv. Environ. Biol.*, 5(8), 2501-2508.
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., Robles, A. A. C. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista latinoamericana de microbiología*, 46(1-2), 24-46.
- Fountain, J. C., Bajaj, P., Nayak, S. N., Yang, L., Pandey, M. K., Kumar, V., & Varshney, R. K. (2016). Responses of *Aspergillus flavus* to oxidative stress are related to fungal development regulator, antioxidant enzyme, and secondary metabolite biosynthetic gene expression. *Frontiers in microbiology*, 7, 2048.
- Fu J., Liu Z., Li Z., Wang Y., Yang K. (2017). Alleviation of the effects of saline-alkaline stress on maize seedlings by regulation of active oxygen metabolism by *Trichoderma asperellum*. *PLoS ONE* 12(6): e0179617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179617>.



- Galvan-Ampudia CS, Julkowska MM, Darwish E, Gandullo J, Korver RA, Brunoud G, Haring MA, Munnik T, Vernoux T, Testerink, C. (2013). Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. *Current Biology* 23, 2044–2050.
- Gapińska, M., Skłodowska, M., & Gabara, B. (2007). Effect of short and long term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(1), 11–18.
- Garciadeblas, B., Rubio, F., Quintero. F.J., Bañuelos, M.A., Haro, R. & Rodríguez-Navarro A. (1993). Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 236:363-368.
- Garg, N., & Chandel, S. (2012). Role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on growth, cadmium uptake, osmolyte, and phytochelatin synthesis in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. under NaCl and Cd stresses. *Journal of plant growth regulation*, 31(3), 292-308.
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S.L., & G.R. Fink. (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(4):1480-5.
- Ghias S. and Rab A. (2017). The Influence of Salinity and Drought Stress on Sodium, Potassium and Proline content of *Solanum lycopersicum* L. cv. Rio Grande. *Pak. J. Bot.*, 49(1): 1-9.
- Ghoulam, C., Foursy, A., Fares, K. (2002). Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.*, 47, 39-50.
- Gindrat, D. (1977). Effets de concentrations élevées de sels sur la croissance, la sporulation et la pigmentation de *Trichoderma* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 23(5), 607–616.
- Giuffrida, F.; Scuderi, D.; Giurato, R.; Leonardi, C. (2013). Physiological response of broccoli and cauliflower as affected by NaCl salinity. *Acta Hortic.* 1005, 435–441.
- Glenn EP, Brown JJ, Blumwald E. (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit Rev Plant Sci.*18: 227–255.

- Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem.* 39:1968-1977.
- Griffith, G. S., & Boddy, L. (1991). Fungal decomposition of attached angiosperm twigs: III. Effect of water potential and temperature on fungal growth, survival and decay of wood. *New phytologist*, 117(2), 259-269.
- Guerrier, G. (1996). Relation between salt tolerance and photosynthetic capacity and (in) organic solute concentrations of *vitro* plants of *Lycopersicon pennellii* and *L-esculentum*. *Agrochimica*, 40(5-6), 263-275.
- Guma, I.R., Padrón-Mederos, M.A., Santos-Guerra, A., and Reyes-Betancort, J.A. 2010. Effect of temperature and salinity on germination of *Salsola vermiculata* L. (Chenopodiaceae) from Canary Islands. *J. Arid Environ.* 74(6): 708–711.
- Gyawali, S., Parkin, I.A., Steppuhn, H., Buchwaldt, M., Adhikari, B., Wood, R., Wall, K., Buchwaldt, L., Singh, M., Bekkaoui, D., Hegedus, D.D. (2019). Seedling, early vegetative, and adult plant growth of oilseed rapes (*Brassica napus* L.) under saline stress. *Canadian Journal of Plant Science*, 99, 927 - 941.
- Hajiboland, R.; Norouzi, F.; Poschenrieder, C. (2014) Growth, physiological, biochemical and ionic responses of pistachio seedlings to mild and high salinity. *Trees Struct. Funct.*, 28, 1065–1078.
- Hameed, A., Egamberdieva, D., Abd-Allah, E. F., Hashem, A., Kumar, A., and Ahmad, P. (2014). “Salinity stress and arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants,” in *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, Vol. 1, ed. M. Miransari (New York, NY: Springer), 139–159.
- HanumanthaRao, B., Nair, R. M., & Nayyar, H. (2016). Salinity and high temperature tolerance in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] from a physiological perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7, 957.
- Hariadi, Y., Marandon, K., Tian, Y., Jacobsen, S. E., Shabala, S. (2011). Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants grown at various salinity levels. *J. Exp. Bot.* 62, 185–193.

- Harman GE. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from reasearch on *Trichoderma harzianum* T- 22. *Plant Disease* 84:377–93.
- Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., & Chen, J. (2004b). Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2), 147-153.
- Harman, G.E. (2011). Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol*; 189:647–52.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004a). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56.
- Harris, R.F., (1981). Effect of water potential on microbial growth and activity. In; Par, J.F., W.R. Gardner, L.F. Elliot (eds.), *Water potential relations in soil microbiology*. Special Publication No. 9. Soil Science Society of America. Madison, pp. 23-25.
- Hasegawa, P.M. (2013). Sodium (Na<sup>+</sup>) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany* 92: 19-31.
- Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Al Huqail, A. A., and Egamberdieva, D. (2014). Alleviation of abiotic salt stress in *Ochradenus baccatus* (Del.) by *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier. *J. Plant Interact.* 9, 857–868.
- Hayat S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environment: A review. *Plant Signaling and Behavior* 7, 1456-1466.
- He, X. J., Mu, R.-L., Cao, W.-H., Zhang, Z.-G., Zhang, J.-S., Chen, S.-Y. (2005). AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J.* 44, 903–916.
- He, Y., Wu, Z., Wang, W., Ye, B. C., Zhang, F., Liu, X. (2019). Different responses of *Capsicum annuum* L. Root and shoot to salt stress with *Pseudomonas putida* Rs-198 inoculation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(3), 799-811.
- Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158, 17–25.

- Hermosa, R., Cardoza, R. E., Rubio, M. B., Gutiérrez, S., & Monte, E. (2014). Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 125-137). Elsevier.
- Hessini, K., S. Ferchichi, S. B. Youssef, K. H. Werner, C. Cruz, M. Gandour. (2015). How does salinity duration affect growth and productivity of cultivated barley? *Agron. J.* 107: 174-180.
- Hidangmayum A. and Dwivedi P. (2018). Plant Responses to *Trichoderma* spp. and their Tolerance to Abiotic Stresses: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 7(1): 758-766.
- Horie T., Kaneko T., Sugimoto G., Sasano S., Panda S.K., Shibasaka M., Katsuhara M. (2011). Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots, *Plant Cell Physiol.* 52 663e675.
- Horie, T., Karahara, I., & Katsuhara, M. (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice*, 5(1), 1-18.
- Huang, X.Q., Chen, L.H., Ran, W., Shen, Q.R. (2011). *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91, 741–755.
- Ioannou, N. S. R. W., Schneider, R. W., Grogan, R. G., & Duniway, J. M. (1977). Effect of water potential and temperature on growth, sporulation, and production of microsclerotia by *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 67, 637-644.
- Iyengar, E.R.R. & Reddy, M.P. (1996). Photosynthesis in highly salt tolerant plants. In: Pesserkali M (ed) *Handbook of photosynthesis*. Marshal Dekar, Baten Rose, USA, pp 897-909.
- Jaklitsch, W.M. & H. Voglmayr. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* 80:1-87.
- James R. A., Blake C., Byrt C. S., Munns R. (2011). Major genes for Na<sup>+</sup> exclusion, Nax1 and Nax2 wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na<sup>+</sup> accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *J. Exp. Bot.* 62 2939–2947.

- Jamila, Z., Arbi, G., Mohamed, N. (2010). Germination responses of *Spartidium saharae* (Coss. & Dur.) Pomel (Fabaceae) to temperature and salinity. *African J. Ecol.* 48(1): 37–44.
- Jeschke, W. D. (1984).  $K^+$  -  $Na^+$  exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. *Salinity tolerance in plants strategies for crop improvement*, 37-66.
- Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A., Li, X. (2013). The salt overly sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Mol. Plant* 6, 275–286.
- Ji, T., Li, S.Z., Huang, M.L., Di, Q.H., Wang, X.F., Wei, M., Shi, Q.H., Li, Y., Gong, B., Yang, F.J., (2017). Overexpression of cucumber phospholipase D alpha gene (*CsPLD $\alpha$* ) in tobacco enhanced salinity tolerance by regulating  $Na^+$ - $K^+$  balance and lipid peroxidation. *Front. Plant Sci.* 8, 499.
- Julkowska MM, Hoefsloot HCJ, Mol S, Feron R, de Boer GJ, Haring MA, Testerink C (2014). Capturing *Arabidopsis* root architecture dynamics with root-fit reveals diversity in responses to salinity. *Plant Physiology* 166, 1387–1402.
- Julkowska MM., Testerink C. (2015). Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends in Plant Science* 20, 586–594.
- Jung J.K., McCouch S. (2013). Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science* 4, 186.
- Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, Azarova T, Makarova N, Lugtenberg B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact.* 19:250- 256.
- Kamran M., Parveen A., Ahmar S., Malik Z., Hussain S., Chattha M.S, Saleem M.H., Adil M., Heidari P., Chen J. (2020). An Overview of Hazardous Impacts of Soil Salinity in Crops, Tolerance Mechanisms, and Amelioration through Selenium Supplementation. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 148.
- Kamran, M.; Malik, Z.; Parveen, A.; Huang, L.; Riaz, M.; Bashir, S.; Mustafa, A.; Abbasi, G.H.; Xue, B.; Ali, U. (2019). Ameliorative Effects of Biochar on Rapeseed (*Brassica*

- napus* L.) Growth and Heavy Metal Immobilization in Soil Irrigated with Untreated Wastewater. In *Journal of Plant Growth Regulation*; Springer: Berlin, Germany; pp. 1–16.
- Kawahara, Y., Kikuchi, Y., Kurahashi, O., Kimura, E., Nakamatsu, T., Goto, S. (2002). Stress-resistant microorganism and method of producing fermentative product. Nº 6.338.956. Patente de EE. UU.
  - Kim, K., Jang, Y. J., Lee, S. M., Oh, B. T., Chae, J. C., & Lee, K. J. (2014). Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants. *Molecules and cells*, 37(2), 109.
  - Koornneef, A., & Pieterse, C. M. (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant physiology*, 146(3), 839-844.
  - Kredics, L., Antal, Z., & Manczinger, L. (2000). Influence of water potential on growth, enzyme secretion and in vitro enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. *Current Microbiology*, 40(5), 310-314.
  - Kumar K., Amaresan N., Madhuri K. (2017a). Alleviation of the adverse effect of salinity stress by inoculation of plant growth promoting rhizobacteria isolated from hot humid tropical climate. *Ecological Engineering* 102, 361–366.
  - Kumar, K., Manigundan, K., & Amaresan, N. (2017b). Influence of salt tolerant *Trichoderma* spp. on growth of maize (*Zea mays*) under different salinity conditions. *Journal of basic microbiology*, 57(2), 141-150.
  - Kurth, E., Cramer, G. R., Lauchli, A., and Epstein, E. (1986). Effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on cell enlargement and cell production in cotton roots. *Plant Physiol.* 82, 1102–1106.
  - Läuchli, A., Grattan, S.R. (2007). Crecimiento y desarrollo de plantas bajo estrés de salinidad. En *Avances en la cría molecular hacia cultivos tolerantes a la sequía y la sal*; Springer: Dordrecht, Países Bajos; pp. 1-32.
  - Leo Daniel, A. E., Praveen Kumar, G., Desai, S., Mir Hassan, A. S. K. (2011). *In vitro* characterization of *Trichoderma viride* for abiotic stress tolerance and field evaluation against root rot disease in *Vigna mungo* L. *J Biofertil Biopestici*, 2(3), 1-5.
  - Li, J.-Y., Jiang, A.-L., & Zhang, W. (2007). Salt stress-induced programmed cell death in rice root tip cells. *J. Integr. Plant Biol.* 49, 481–486.

- Liang W., Ma X., Wan P., Liu L. (2018). Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1-6.
- Lindsey DL & Baker R. (1967). Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 57:1262–3.
- Lira-Méndez, K., & Mayek-Pérez, N. (2006). Variable osmotic potential of the *in vitro* growth of *Fusarium* spp. and its pathogenicity on bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 88-97.
- Liu S, Li W, Wu Y, Chen C, Lei J (2013). De novo transcriptome assembly in chili pepper (*Capsicum frutescens*) to identify genes involved in the biosynthesis of capsaicinoids. *PLOS One* 8(1-e48156): 1-8.
- Loper, J.E., Buyer, J.S., (1999). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol. Plant. Microbe. In.*, 4, 5–13.
- López-Bucio J, Pelagio-Flores R, Herrera-Estrella A. (2015). *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci Hortic.* 196:109-123.
- Luna-Flores, W., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J. J. M., Pinzón-López, L. L. (2012). Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y eficiencia del uso del agua en plántulas de tres especies arbóreas caducifolias. *Terra Latinoamericana*, 30(4), 343-353.
- Maas, E. V., & Hoffman, G. J. (1977). Crop salt tolerance—current assessment. *Journal of the irrigation and drainage division*, 103(2), 115-134.
- Maas, E. V. (1990). Crop salt tolerance. In 'Agricultural salinity assessment and management', KK Tanji. *ASCE Manuals and Reports on Engineering practice*, (71).
- Maathuis F.J.M. (2014). Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany* 65, 849-858.
- Machado, R. M. A. & Serralheiro, R. P. (2017). Soil salinity: effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulturae*, 3(2), 30.
- Maggio, A., Dalton, F. N., & Piccinni, G. (2002). The effects of elevated carbon dioxide on static and dynamic indices for tomato salt tolerance. *European Journal of Agronomy*, 16(3), 197-206.

- Malagoli P., Britto, D.T., Schulze, L.M., Kronzucker, H.J. (2008). Futile Na<sup>+</sup> cycling at the root plasma membrane in rice (*Oryza sativa* L.): kinetics, energetic, and relationship to salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany* 59, 4109-4117.
- Mallahi, T.; Saharkhiz, MJ; Javanmardi, J. (2018). Salicylic acid changes morpho-physiological attributes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) under salinity stress. *Acta Ecol. Sin.*, 38, 351–355.
- Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Polyphasic taxonomy and variability in the genus *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30 (Suppl. 1).
- Martinez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M., & Baccou, J. C. (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiology*, 127(1), 334-344.
- Martínez-Medina, A., Pascual, J. A., Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., & Roldán, A. (2010). *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. *Phytopathology*, 100(7), 682-688.
- Martínez-Medina, A., Roldán, A., Albacete, A., Pascual, J. A. (2011). The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. *Phytochemistry* 72, 223–229.
- Mastouri, F., Björkman, T., & Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), 1213-1221.
- Mastouri, F., Bjorkman, T., Harman, G. E. (2012). *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 1264–1271.
- Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B.R., (2004). Plant growthpromoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 42, 565–572.
- Mazón Suástegui, J. M., B. Murillo-Amador, D. Batista-Sánchez, Y. Agüero-Fernández, M. R. García-Bernal, C. M. Ojeda Silvera. (2018). *Natrum muriaticum* as an attenuant of NaCl-salinity in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Nova Sci.* 10: 120-136.



- Milla, A. (2006). *Capsicum* de capsula, cápsula el pimiento. Pimientos, Compendios de Horticultura. Capítulo 2. Pp. 21-31.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* 33, 453-467.
- Mishra, A. & Choudhuri, M. A. (1999). Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biol. Plant.* 42, 409–415.
- Mohamed, H.A.L.A. & Haggag, W.M. (2006). Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(2), 181-191.
- Mukherjee, PK, Horwitz BA, Kenerley CM. (2012b). Secondary metabolism in *Trichoderma* a genomic perspective. *Microbiology* 158:35–45.
- Mukherjee, P. K., Buensanteai, N., Moran-Diez, M. E., Druzhinina, I. S., & Kenerley, C. M. (2012a). Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. *Microbiology*, 158(1), 155-165.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual review of phytopathology*, 51, 105-129.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25:239–250.
- Munns, R. and Tester M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:651-681.
- Munns, R., Goyal S.S. & Passioura J. (2005). The impact of salinity stress. In: Blum A., ed. *The Plant stress*, <http://www.plantstress.com/Articles/index.asp>.
- Musito-Ramírez, N., Vega-Sánchez, M. C., Rodríguez-Valdés, J. G., Padrón-Corral, E. (2004). Genotipos de maíz tolerantes a salinidad; un estudio preliminar para iniciar un programa de selección. *Revista Agraria-Nueva Epoca-Año I*. Vol, 1(3).

- Navarro, J.M., Garrido, C., Martinez, V., Carvajal, M., (2003). Water relations and xylem transport of nutrients in pepper plants grown under two different salts stress regimes. *Plant Growth Regul.* 41, 237–245.
- Nicholson, W. L. (2004). Ubiquity, longevity, and ecological roles of *Bacillus* spores. *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications*, 1-15.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(3), 548-572.
- Ochiai, N., Tokai, T., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M., & Kimura, M. (2007). Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Biochemical and biophysical research communications*, 363(3), 639-644.
- Olaiya, C. & Poloamina, L. (2013). Changes in the contents of carotenoid, chlorophyll and antioxidant enzymes in the leaf tissues of Pepper (*Capsicum annum* L.) following exogenous application of bioregulators. *Nat Sci* 11:9–13.
- Orosco-Alcalá, B.E., Núñez-Paleniús, H.G., Pérez-Moreno, L., Valencia-Posadas, M., Trejo-Téllez L.I., Díaz-Serrano, F.R., Ruiz-Nieto, J.E., Abraham-Juárez, M.R. (2018). Tolerancia a salinidad en plantas cultivadas: una visión agronómica. *Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 7*, pp: 51-57.
- Ortuño, N., Miranda, C., Claros, M. (2013). Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 1(1), 16-32.
- Paellob, F. (2010). Root length, ion uptake and relationship with salinity tolerance in wheat, rice and prewiff. *Plant Growth Regulat.* 1: 46-54.
- Palao, C. D. C., Viña, C. B. D., Gregorio, G. B., & Singh, R. K. (2014). A new phenotyping technique for salinity tolerance at the reproductive stage in rice. *ORYZA-An International Journal on Rice*, 50(3), 199-207.

- Pang, Q., Chen, S., Dai, S., Chen, Y., Wang, Y., & Yan, X. (2010). Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of proteome research*, 9(5), 2584-2599.
- Parida, A.K., Das, A.B., Das, P. (2002). NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol.*, 45, 28-36.
- Park, S. M., Choi, E. S., Kim, M. J., Cha, B. J., Yang, M. S., & Kim, D. H. (2004). Characterization of HOG1 homologue, CpMK1, from *Cryphonectria parasitica* and evidence for hypovirus-mediated perturbation of its phosphorylation in response to hypertonic stress. *Molecular microbiology*, 51(5), 1267-1277.
- Pelizza, S.A., Lastra, C.L., Becnel, J.J., Bisaro, V., Garcia, J.J. (2007). Effects of temperature, pH and salinity on the infection of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Peronosporomycetes) in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 133-137.
- Perica, S., Goreta, S., Selak, G.V. (2008). Growth, biomass allocation and leaf ion concentration of seven olive (*Olea europaea* L.) cultivars under increased salinity. *Sci Hortic* 117:123-129.
- Pichu, R. (2002). Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 42, 351-361.
- Pill, W. G., Collins, C. M., Goldberger, B., Gregory, N. (2009). Responses of non-primed or primed seeds of 'Marketmore 76' cucumber (*Cucumis sativus* L.) slurry coated with *Trichoderma* species to planting in growth media infested with *Pythium aphanidermatum*. *Scientia horticulturae*, 121(1), 54-62 pp.
- Pilon-Smits, E.A.H., Quinn, C.F., Tapken, W., Malagoli, M., Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 267-274.
- Pires, I.S., Negrão, S., Pentony, M.M., Abreu, I.A., Oliveira, M.M., Purugganan, M.D. (2013). Different evolutionary histories of two cation/proton exchanger gene families in plants. *BMC Plant Biology*.

- Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R.J., Fairbairn, D.J. (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Science* 11, 372-374.
- Plett, D.C. & Moller, I.S. (2010). Na<sup>+</sup> transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant, Cell and Environment* 33, 612-626.
- Pozo, C. O & Ramírez, M. M. (2003). Diversidad e importancia de los chiles silvestres. En: Memoria del Simposio regional sobre chile piquín. (1:2003 marzo. 3-7: Tamaulipas), p. 17.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., & H. Sychrova. (1996). Characterization of the NHA1 gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 387(1):89-93.
- Qi, W. & Zhao, L. (2013). Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *J Basic Microb.* 53(4):355–364.
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., ... & Yang, Y. (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5135-5140.
- Qiu, Q.S., Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Zhu, J.K., Schumaker, K.S. (2003). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132, 1041-1052.
- Queirós, F., Fontes, N., Silva, P., Almeida, D., Maeshima, M., Gerós, H. (2009). Activity of tonoplast proton pumps and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in potato cell cultures is modulated by salt. *J. Exp. Bot.* 60, 1363–1374.
- Rabeendran, N., Moot, D. J., Jones, E. E., & Stewart, A. (2000). Inconsistent growth promotion of cabbage and lettuce from *Trichoderma* isolates. *New Zealand Plant Protection*, 53, 143-146.
- Ramos, E. Y. A., Navarro, R. I. Z., Zumaqué, L. E. O., & Violeth, J. L. B. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista colombiana de biotecnología*, 10(2), 23-34.

- Rasool, S., Ahmad, A., Siddiqi, T. O., & Ahmad, P. (2013). Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. *Acta physiologiae plantarum*, 35(4), 1039-1050.
- Rawat, L., Singh, Y., Shukla, N., Kumar, J. (2011). Alleviation of the adverse effects of salinity stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) by seed biopriming with salinity tolerant isolates of *Trichoderma harzianum*. *Plant Soil* 347, 387–400.
- Rawat, L., Singh, Y., Shukla, N., Kumar, J. (2013). Salinity tolerant *Trichoderma harzianum* reinforces NaCl tolerance and reduces population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under salt stress conditions. *Archives of phytopathology and plant protection*, 46 (12), 1442-1467.
- Regragui, A. & Lahlou, H. (2005). Effect of salinity on *in vitro* *Trichoderma harzianum* antagonism against *Verticillium dahliae*. *Pak. J. Biol. Sci.*, 8(6), 872-876.
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89-123.
- Rifai, M. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap.*; 116:1-56.
- Rodríguez-Álvarez, M., N. Morales-Roblero, D. Batista-Sánchez y J. M. Mazón-Suástegui. (2020). *Natrum muriaticum* atenúa el estrés por NaCl en *Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*. *Terra Latinoamericana Número Especial* 38-1: 199-218.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Gálvez, F. J., Huertas, R., Aranda, M. N., Baghour, M., Cagnac, O., et al. (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal. Behav.* 4, 265–276.
- Roy, S. J., Negrão, S., & Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 115–124.
- Rubio, F., Flores, P., Navarro, J. M., & Martínez, V. (2003). Effects of Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and cGMP on Na<sup>+</sup> uptake in pepper plants. *Plant Sci.* 165, 1043–1049.
- Rubio, M. B., Quijada, N. M., Pérez, E., Domínguez, S., Monte, E., and Hermosa, R. (2014). Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1864–1873.

- Samapundo, S., Deschuyffeleer, N., Van Laere, D., De Leyn, I., & Devlieghere, F. (2010). Effect of NaCl reduction and replacement on the growth of fungi important to the spoilage of bread. *Food microbiology*, 27(6), 749-756.
- Samuels, G.J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycol Res.*; 100(8):923-935.
- Sánchez-Fernández, R.E., Sánchez-Ortiz, B.L., Sandoval-Espinosa, Y.K.M., Ulloa-Benítez, A., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M.C., Macías-Rubalcava, M.L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2):132-146.
- Sandle, T. (2014). *Trichoderma*. p. 644-646. En C.A. Batt y M.-L. Tortorello (eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology*, London, UK.
- Scala, F., Raio, A., Zoina, A., Lorito, M., Chincholkar, S., & Mukerji, K. (2007). Biological control of fruit and vegetable diseases with fungal and bacterial antagonists: *Trichoderma* and *Agrobacterium*. *Biological control of plant diseases*, 6, 151-178.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2009). *El Medio Ambiente en México: En Resumen 2009*. México. Gobierno Federal. ([www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)) pp. 20-23.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2003). *Degradación en el suelo*. Gobierno Federal. ([www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)) pp. 20-23.
- Shabala, S., & Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia plantarum*, 151(3), 257-279.
- Shannon, M.C., Grieve, C.M., (1999). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Sci. Hortic.* 78, 5–38.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Zhu, J-K. (2002). The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. *The Plant Cell* 14, 465-477.

- Shores, M., Gal-On, A., Leibman, D., & Chet, I. (2006). Characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from cucumber required for *Trichoderma*-conferred plant resistance. *Plant physiology*, 142(3), 1169-1179.
- Shores, M., Mastouri, F., & Harman, G. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 21–43.
- Shukla, N., Awasthi, R. P., Rawat, L., & Kumar, J. (2012). Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 54, 78-88.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). Exportación de Chile. Consultado 17-09-2019 en [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257072/PotencialChiles\\_y\\_Pimientos-parte\\_uno.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257072/PotencialChiles_y_Pimientos-parte_uno.pdf)
- Siddiquee, S., Tan, S. G., & Yusof, U. K. (2010). Isozyme analysis and relationships among three species in Malaysian *Trichoderma* isolates. *J. Microbiol. Biotechnol*, 20(9), 1266-1275.
- Siddiquee, S. (2014). Recent advancements on the role and analysis of volatile compounds (VOCs) from *Trichoderma*. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 139-175). Elsevier.
- Singh, H. B. (2014). Management of plant pathogens with microorganisms. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 2, 443-454.
- Sivasithamparam, K. & Ghisalberti, EL. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek CP, Harman GE (eds). *Trichoderma and Gliocladium*. London: Taylor and Francis, 139–91.
- Slater, G.P., Haskins, R.H., Hogge, L.R., Nesbitt, L.R. (1967). Metabolic products from a *Trichoderma viride* Pers. ex Fries. *Canadian Journal of Chemistry* 45, 92–96.
- Snapp, S. S., and Shennan, C. (1992). Effects of salinity on root growth and death dynamics of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *New Phytol.* 121, 71–79.
- Snapp, SS; Shennan, C.; Bruggen, AV. (1991). Effects of salinity on severity of infection by *Phytophthora parasitica* Dast., ion concentrations and growth of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Nuevo Phytol*, 119, 275–284.

- Sofo, A., Scopa, A., Manfra, M., De Nisco, M., Tenore, G., Troisi, J., & Novellino, E. (2011). *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* × *P. canescens*). *Plant growth regulation*, 65(2), 421-425.
- Soliman, H.G., El-Sheikh, H.H., Lashine, I.F. (1994). Influencia del estrés salino en ciertas actividades metabólicas de *Aspergillus terreus* y *A. tamarii* aisladas del agua del mar Mediterráneo. *Al-Azhar J. Microbiol.*, 24, 46-57.
- Solís-Marroquín, D.; Lecona-Guzmán, C.A.; Ruiz-Lau, N.; Ocampo, P.; Rodas-Trejo, J.; Gonzales-Santiago, C.; González-Mejía, O.; Gordillo-Páez, L. (2017). Análisis bromatológico de frutos de chile “siete caldos” (*capsicum annuum*) cultivados en condiciones de cielo abierto y casa sombra. *Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 9, septiembre. 2017. pp: 34-40.*
- Sonneveld, C., (1988). The salt tolerance of greenhouse crops. *Neth. J. Agric. Sci.* 36, 63–73.
- Srivastava, S. and Srivastava, S. (2020). Prescience of endogenous regulation in *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas putida* MTCC 5279 under phosphate starved salinity stress condition. *Scientific Reports* 10:5855.
- Subbarao, K. V., & Michailides, T. J. (1992). A re-evaluation of *Fusarium moniliforme* var. *fici*, the causal agent of fig endosepsis. *Mycological Research*, 96(9), 766-768.
- Subramanyam, K., Sailaja, K. V., Subramanyam, K., Rao, D. M., & Lakshmidevi, K. (2011). Ectopic expression of an osmotin gene leads to enhanced salt tolerance in transgenic chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(2), 181-192.
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K. (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *The Plant Journal* 44, 928-938.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2010). *Plants Physiology*. Fifth edition. Sinauer Associates Inc., Publisher. Sunderland, Massachusetts, USA. 782 p.



- Takahashi, R., Nishio, T., Ichizen, N., Takano, T. (2007). Cloning and functional analysis of the K<sup>+</sup> transporter PhaHAK2 from salt-sensitive and salt-tolerant reed plants. *Biotechnology Letters* 29, 501-506.
- Tamás, M. J., & Hohmann, S. (2003). The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Yeast stress responses* (pp. 121-200). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tijerina-Ramírez, N., Lira-Méndez, K., Moreno-Medina, V. R., González-Prieto, J. M., & Mayek-Pérez, N. (2014). Efecto del estrés osmótico in vitro en el crecimiento, patogenicidad y producción de osmolitos en *Macrophomina phaseolina*. *Revista mexicana de micología*, 39, 31-39.
- Todorovic, B. & Glick, BR. (2008). The interconversion of ACC deaminase and D-cysteine desulphhydrase by directed mutagenesis. *Planta* 229:193–205.
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C.F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J.A, Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86:947-961.
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 341-354.
- Van Wees, S. C., Van der Ent, S., & Pieterse, C. M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 443-448.
- Vasantha, S. & R. Rajlakshmi. (2009). Progressive changes in biochemical characters of sugarcane genotypes under salinity stress. *Ind. J. Plant Physiol.*, 14, 34-38.
- Viterbo, A, Landau, U, Kim, S, Chernin, L, Chet, I. (2010). Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett* 305:42–48.
- Volkov, V., Amtmann, A. (2006). *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, has specific root ion-channel features supporting K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis under salinity stress. *The Plant Journal* 48, 342-353.
- Wadskog, I., & Adler, L. (2003). Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. In *Yeast stress responses* (pp. 201-239). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Westphal, A. J., Price, P. B., Leighton, T. J., & Wheeler, K. E. (2003). Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3461-3466.
- Wieland, J., Nietsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H., H.K. Rudolph. (1995). The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* 14:3870-3882.
- Xu, Y. (2016). Envirotyping for deciphering environmental impacts on crop plants. *Theoretical and Applied Genetics* 129: 653-673.
- Yadav, S., Irfan, M., Ahmad, A. & Hayat, S. (2011). Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. *Journal of Environmental Biology* 32, 667-685.
- Yamaguchi, T., Hamamoto, S., Uozumi, N. (2013). Sodium transport system in plant cells. *Frontier in Plant Science* 4.
- Yang, T., Zhang, S., Hu, Y., Wu, F., Hu, Q., Chen, G., Cai, J., Wu, T., Moran, N., Yu, L., Xu, G. (2014). The role of potassium transporter OsHAK5 in potassium acquisition and transport from roots to shoots in rice at low potassium supply levels. *Plant Physiology* 166, 945-959.
- Yasmeen, R., & Siddiqui, Z. S. (2017). Physiological responses of crop plants against *Trichoderma harzianum* in saline environment. *Acta Botanica Croatica*, 76(2), 154-162.
- Zehra, A., Dubey, M. K., Meena, M., & Upadhyay, R. S. (2017). Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species. *Journal of Environmental Biology*, 38(2), 197.
- Zeilinger, S., S. Gruber, R. Bansal, & P.K. Mukherjee. 2016. Secondary metabolism in - chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews* 30(2):74-90.
- Zepeda-Jazo, I., Velarde-Buendía, A.M., Enríquez-Figueroa, R., Bose J., Shabala, S., Muñoz-Munguía, J., Pottosin, I. (2011). Polyamines interact with hydroxyl radicals in activating Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> transport across the root epidermal plasma membranes. *Plant Physiology* 157, 2167-2180.

- Zhang, F., Liu, Z., Gulijimila, M., Wang, Y., Fan, H., & Wang, Z. (2016b). Functional analysis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene of the biocontrol fungus *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Can. J. Plant Sci.* 96: 265–275.
- Zhang, J-L., Shi, H. (2013). Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynthesis Research* 115, 1-22.
- Zhang, SW, Gan, YT, Xu, BL. (2016a). Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Front Plant Sci.* 7:1405.
- Zhang, F., Wang, Y., Liu, C., Chen, F., Ge, H., Tian, F., Zhang, Y. (2019). *Trichoderma harzianum* mitigates salt stress in cucumber via multiple responses. *Ecotoxicology and environmental safety*, 170, 436-445.
- Zhen, Z., Xiong, X., Liu, Y., Zhang, J., Wang, S., Li, L., Gao, M. (2019). NaCl inhibits citrinin and stimulates *Monascus* pigments and monacolin K production. *Toxins*, 11(2), 118.
- Zhifang, G. & W.H. Loescher. (2003). Expression of a celery mannose-6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. *Plant Cell Environ.*, 26, 275-283.
- Zhu, J.K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* 6:441-445.
- Zhu, J. K., Liu, J., & Xiong, L. (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *The Plant Cell*, 10(7), 1181-1191.
- Zidan, I., Azaizeh, H. & Neumann, P. M. (1990). Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification? *Plant Physiol.* 93, 7–11.
- Zivdar, S., Khaleghi, E., and Dehkordi, F.S. (2011). Effect of salinity and temperature on seed germination indices of *Zinnia elegans* L. *J. Appl. Hort.* 13(1): 48–51.
- Zolla, G., Heimer, Y. M., & Barak, S. (2010). Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of experimental botany*, 61(1), 211-224.

