



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ÁREA ACADÉMICA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Trichoderma asperellum* EN
PLANTAS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum*) EXPUESTAS
A ESTRÉS POR FRÍO**

TESIS

QUE PARA OPTENER EL GRADO DE:
**MAESTRA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA
Y FORESTAL SUSTENTABLE**

PRESENTA:

ING. AGRÓNOMA MARÍA DEL PILAR OSORNO SUÁREZ
DIRECTORA: DRA. MARIANA SAUCEDO GARCÍA



TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO; NOVIEMBRE, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Agropecuarias
School of Forestry and Environmental Studies

Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

ICAP-MCTAFS/001/2021

M en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E

Por este conducto se le comunica que el Comité Revisor asignado a la alumna **María del Pilar Osorno Suárez**, de la Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable, con número de cuenta **No. 281135**, que presenta el manuscrito de tesis titulado **“Evaluación del efecto de *Trichoderma asperellum* en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) expuestas a estrés por frío”**, ha autorizado la impresión del mismo.

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
“Amor, Orden y Progreso”

Tulancingo de Bravo, Hgo. al 04 de Noviembre del 2021.

Dra. Eliazar Aquino Torres
Coordinadora de la Maestría en
Ciencias y Tecnología Agrícola y
Forestal Sustentable



Dr. Armando Peláez Acero
Director del ICAP



Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aqueztalpa,
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México. C.P. 43800
Teléfono: +52 (771) 71 72000 ext 2481
pelaeza@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis titulada: "Evaluación del efecto de *Trichoderma asperellum* en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) expuestas a estrés por frío", que desarrolla la estudiante María del Pilar Osorno Suárez.

Asistentes:

Dra. Mariana Saucedo García
Dra. Ma. Isabel Reyes Santamaría
Dr. Víctor Hugo Pérez España
Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por María del Pilar Osorno Suárez, comunicando que la estudiante, realizó oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 03 de Noviembre de 2021

Dra. Mariana Saucedo García

_____ Mariana S.G. _____

Dra. Ma. Isabel Reyes Santamaría

_____ _____

Dr. Víctor Hugo Pérez España

_____ _____

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

_____ _____





DEDICATORIA

Con cariño, admiración y respeto dedico este humilde trabajo a todos los sabios agricultores mexicanos que audazmente preparan el vivo suelo, para cultivar los deliciosos frutos que sostienen nuestra vida como seres humanos, así como a toda mi familia que tanto amo, gracias por sostener mi vida amorosamente entre sus fuertes brazos.

AGRADECIMIENTOS

Durante mis estudios de maestría, redescubrí mi instituto, aquel que siempre estuvo para mi formación profesional y como sede de los recuerdos más divertidos con mis compañeros y amigos. Agradezco la dedicación de cada docente, que supo integrar en mi cerebro el conocimiento teórico y práctico que me ha formado, gracias por la disciplina, el respeto y el compromiso por las ciencias agrícolas.

He sido afortunada por contar con la firme dirección de la Dra. Mariana Saucedo García, muchas gracias Doctora por cultivar en mi la curiosidad y el pensamiento crítico a través del estudio de mi honguito *Trichoderma*, por enseñarme bonito cada tópico y protocolo que son cimiento de este trabajo, gracias por confiarme tiempo y dedicación en charlas llenas de conocimiento y buen humor, además de brindarme su escucha en momentos alegres de mi vida y en los que no lo fueron tanto. Y especialmente gracias por ser mi guía en el camino de la ciencia, la admiro mucho.

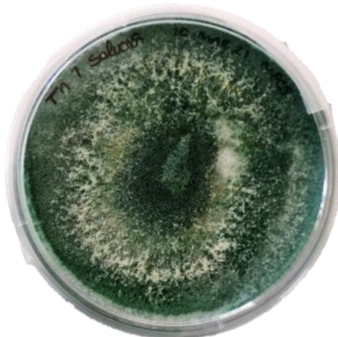
Estoy contenta y agradecida pues en mis sinodales siempre encontré valiosas opiniones que nutrieron este trabajo de investigación, tanto en contenido como en consejos de redacción. Muchas gracias Dra. Ma. Isabel Reyes Santamaria usted que me conoció desde que era la chica que fue oyente en la licenciatura, gracias por todas sus enseñanzas. Gracias Dr. Javier Andrés Juárez Díaz porque desde la distancia estuvo al pendiente de la escritura de este trabajo brindándome consejos para mejorar. Gracias Dr. Víctor Hugo Pérez España que junto a la Dra. Teresa Romero Cortés me enseñaron gentilmente en su laboratorio cuando estuve de servicio social hace unos añitos en Apan, gracias Doctor por acompañarme nuevamente y mostrar interés en el desarrollo de este trabajo. Muchas gracias Dr. Sergio Hernández León fue agradable tomar sus clases de Protocolo de investigación, gracias también por facilitarme el Software ImageJ con el que logré llevar a cabo la determinación del área foliar, así como por sus valioso consejos prácticos.

Agradezco infinitamente el amor y la compañía de mi familia. Mi Rosita hermosa: la amo infinitamente, muchas gracias por enseñarnos que con dedicación cada propósito es posible, gracias por ser el firme sistema radicular de esta familia, la amamos muchísimo y nos enorgullece ser sus hijos, gracias por cuidar amorosamente de nosotros y también por compartirnos toda su sabiduría y experiencia, cada día inspira nuestras vidas. Muchas gracias hermanito Aarón, gracias por todo lo bueno que eres, me siento feliz y orgullosa de ti eres mi ejemplo a seguir, muchas gracias por guiarme con dulzura, te amo. ¡Gracias por mi par de enanos! Dani y Oli ustedes son razón de mis alegrías, los amo con toda mi alma, soy feliz de saberme su tía, ambos son magia y valentía, Dani eres fuerte e inteligente admiro tu tenacidad y perseverancia. Oli nos haces muy felices, eres la creatividad andante, sincero, bondadoso e inteligente, muchas gracias por siempre inaugurar nuestro sándwich familiar.

Gracias a mis compañeras de maestría, ¡Viva la generación Fungí!: Gaby felicidades por tu estudio con *Hericum*, Astrid buen trabajo con *Beauveria bassiana* y Karen estoy orgullosa de tu maravilloso trabajo y dedicación con *Trichoderma*. Gracias a todas por el compañerismo.

¡Muchas gracias Karen! por tu amistad, por todas las risas y horas de trabajo compartido en el laboratorio, felices porque al final le ganamos a la apurancia y prevaleció el modo hormiga.

Muchas gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento del Proyecto “Efecto de *Trichoderma* en la aclimatación al frío de plántulas de jitomate” con clave 255265 aprobado en la CONVOCATORIA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA BÁSICA 2015 (CONACyT) y por la beca otorgada con número de apoyo 755544, ya que hizo posible la dedicación a tiempo completo de mis estudios de Maestría, gracias por apoyar el desarrollo de la ciencia agrícola en México.



Crecimiento de *Trichoderma asperellum* en papa dextrosa agar.
Fotografía María del Pilar Osorno Suárez.

ÍNDICE

ÍNDICE	7
Abreviaturas	9
Lista de figuras	10
Resumen	11
CAPÍTULO I. Introducción	12
1. Estrés en plantas.....	12
1.1 Estrés biótico.....	20
1.2 Estrés abiótico.....	12
1.2.1 Estrés por frío en plantas	13
1.2.1.1 Plantas tolerantes al frío.....	14
1.2.1.2 Plantas no tolerantes al frío.....	19
2. El hongo <i>Trichoderma</i> spp. en la agricultura	20
2.1 Interacción planta-hongo e inducción de tolerancia al estrés biótico.....	24
Capitulo II. Antecedentes	26
Capitulo III. Justificación.....	29
Capitulo IV. Objetivos.....	30
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
Capitulo V. Hipótesis	31
CAPÍTULO VI. Materiales y métodos	32
1. Ubicación.....	32
1.1 Material biológico	32
1.2 Germinación de jitomate.....	32
1.3 Obtención de conidios de <i>T. asperellum</i>	32

1.4 Trasplante de jitomate e inoculación con <i>T. asperellum</i>	32
1.5 Aplicación de los tratamientos térmicos	33
1.6 Evaluación del efecto de <i>T. asperellum</i>	34
1. 7 Porcentaje de fuga de electrolitos	34
1. 8 Extracción de clorofilas.....	35
1. 9 Análisis estadístico	35
CAPÍTULO VII. Resultados	36
1. Caracterización fenotípica de las plantas de jitomate	36
2. Índice de crecimiento	37
3. Diámetro de tallo	39
4. Desarrollo foliar de las plantas de jitomate.....	40
5. Longitud de raíz.....	43
6. Biomasa	44
7. Contenido de clorofila.....	45
8. Fuga de electrolitos	47
CAPÍTULO VII. Discusión de resultados	49
CAPÍTULO VIII. Conclusiones.....	53
CAPITULO IX. Perspectivas.....	54
Bibliografía	55

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico (Abscisic acid)
APx	Ascorbato peroxidasa (Ascorbate peroxidase)
CaM	Proteínas calmodulina (Calmodulin)
CAT	Catalasa (Catalase)
CML	Proteínas similares a calmodulina (Calmodulin-like proteins)
CPK	Cinasas dependientes de Ca^{2+} (Ca^{2+} -dependent protein kinases)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
ET	Etileno (Ethylene)
GA	Giberelina (Gibberellin)
GPx	Glutación peroxidasa (Glutathione peroxidase)
GR	Glutación reductasa (Glutathione reductase)
Hsp	Proteínas de choque térmico (Heat shock proteins)
JA	Ácido jasmónico (Jasmonic acid)
MAPK	Cinasas de proteína activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
POD	Peroxidasa (Peroxidase)
PSI	Fotosistema I (Photosystem I)
PSII	Fotosistema II (Photosystem II)
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species)
SA	Ácido salicílico (Salicylic acid)
SOD	Superóxido dismutasa (Superoxide dismutase)
SPAD	Análisis del desarrollo de la planta en el suelo (Soil plant analysis development)
TISR	Respuesta sistémica inducida por <i>Trichoderma</i> (<i>Trichoderma</i> induce systemic resistance)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupos de tratamientos en plantas de <i>S. lycopersicum</i>	33
Figura 2. Evaluación a nivel fenotipo de plantas de <i>S. lycopersicum</i> expuestas a los diferentes tratamientos térmicos.....	37
Figura 3. Índice de crecimiento de <i>S. lycopersicum</i> \pm <i>T. asperellum</i>	39
Figura 4. Diámetro de tallo de <i>S. lycopersicum</i> \pm <i>T. asperellum</i> expresado en milímetros.....	40
Figura 5. Número de hojas de <i>S. lycopersicum</i> \pm <i>T. asperellum</i>	41
Figura 6. Área foliar de <i>S. lycopersicum</i> \pm <i>T. asperellum</i> expresado en cm ²	42
Figura 7. Longitud de raíz de <i>S. lycopersicum</i> \pm <i>T. asperellum</i> expresado en centímetros.....	43
Figura 8. Biomasa de <i>S. lycopersicum</i> \pm <i>T. asperellum</i> expresado gramos.....	44
Figura 9. Contenido de clorofila de <i>S. lycopersicum</i> \pm <i>T. asperellum</i> expresado en unidades SPAD.....	45
Figura 10. Contenido de clorofilas de <i>S. lycopersicum</i> \pm <i>T. asperellum</i> expresado en mg Al ⁻¹	46
Figura 11. Fuga de electrolitos en hojas de <i>S. lycopersicum</i> \pm <i>T. asperellum</i> expresado en porcentaje.....	48

RESUMEN

El cambio climático se define como un cambio de clima caracterizado por fluctuaciones en la temperatura. Los ambientes extremos de los ecosistemas han impactado negativamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas, especialmente de las sensibles al frío de origen tropical y subtropical como *Solanum lycopersicum*.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de *T. asperellum* sobre la tolerancia al frío de *S. lycopersicum* con y sin previa aclimatación. Para ello, se utilizaron plantas de *S. lycopersicum* de seis semanas de edad con y sin *T. asperellum* aclimatadas a 10 °C por 4 días, para posteriormente retarlas a frío (4 °C) durante 12 días; y plantas con y sin *T. asperellum* retadas directamente a frío. Los resultados indicaron que *T. asperellum* favoreció el índice de crecimiento, el diámetro del tallo, el número de hojas y la ganancia de biomasa durante el estrés por frío en plantas sin previa aclimatación, sumado a ello, se identificó una menor fuga de electrolitos en plantas inoculadas. Por lo tanto, se concluye que la inoculación con *T. asperellum* tiene un efecto positivo sobre la tolerancia de *S. lycopersicum* a estrés por frío de manera más eficaz que la previa aclimatación al frío.

1. ESTRÉS EN PLANTAS

El estrés es una tensión física o biológica cuyo origen puede ser un estímulo externo o interno. El estrés provoca una reacción proporcional a su intensidad y temporalidad en el organismo que lo recibe: pequeños episodios de estrés generalmente conllevan a la sobrevivencia del organismo, mientras que, si el factor estresante se prolonga o intensifica, afecta significativamente el equilibrio natural del organismo comprometiendo su existencia (Ahmed *et al.*, 2016).

El impacto negativo del estrés suele medirse en términos de sobrevivencia y por la continuidad del crecimiento y desarrollo de las plantas expuestas a niveles controlados de estrés (Taiz y Zeiger, 2006). Naturalmente, las plantas como cualquier organismo, buscará sobrevivir ante un factor estresante, principalmente mediante la estabilización y regulación de su ambiente interno al mantener su homeostasis celular (Ville, 1985). En general, los factores de estrés se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su origen: biótico y abiótico.

1.1 ESTRÉS ABIÓTICO

En el ambiente, las plantas se encuentran en constante exposición a condiciones adversas que hace difícil su desarrollo óptimo. El estrés abiótico comprende un déficit o exceso de los factores físico-químicos del ambiente (Apel y Hirt, 2004). El estrés abiótico es de importancia en la producción mundial de alimentos, pues provoca pérdidas de cosechas durante cada año agrícola por fenómenos hidrometeorológicos, como lluvias torrenciales, viento extremo, heladas, sequía, granizo y disminución de la temperatura. Para 2019, la Encuesta Nacional Agropecuaria reportó pérdidas del 85% de unidades de producción por factores abióticos, de los cuales, el 32% fue por heladas y disminución de temperatura (SIAP, 2018; INEGI, 2019).

1.1.1 ESTRÉS POR FRÍO EN PLANTAS

El cambio climático como efecto negativo de las actividades antropogénicas, ha implicado una alteración en las características naturales del tiempo atmosférico, es decir, un cambio en el clima normal para un lugar y época del año determinado (Michalek, 2017; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2020). En el ámbito agrícola, los cambios en la temporalidad de lluvias han ocasionado sequía o inundaciones, y las fluctuaciones climáticas de extremo calor e intenso frío (FAO, 2020).

El frío es uno de los factores ambientales que limitan la distribución geográfica, estacionalidad, desarrollo y productividad de diversas especies vegetales (Solanke y Sharma, 2008). Cada especie vegetal crece y se desarrolla en un rango de temperatura que oscila entre una temperatura mínima y una máxima, que incluye a la temperatura óptima en la que se logra el máximo crecimiento de la planta. La sensibilidad de la planta a las temperaturas de su entorno ambiental varía de acuerdo a su origen, la etapa fenológica en la que se encuentre y los cambios abruptos de estos valores (Chaves-Barrantes y Gutiérrez-Soto, 2017; Lata *et al.*, 2018). Se considera una helada cuando la temperatura del aire disminuye hasta 0 °C o menos por un periodo mínimo de cuatro horas; sin embargo, la disminución de la temperatura, puede o no alcanzar los 0 °C y aun así afectar el desarrollo de las plantas (Matías *et al.*, 2001).

El descenso de la temperatura para una especie vegetal de origen templado puede ser enfrentado sin mayores complicaciones gracias al proceso de aclimatación, mientras que el mismo valor de temperatura puede ser dañino o letal para otra planta cuyo origen sea tropical o subtropical. Esto se debe a que las diversas especies vegetales muestran diferente grado de sensibilidad a la temperatura determinado por su origen geográfico (Barrero-Gil *et al.*, 2016; Elkelish *et al.*, 2020).

1.1.1.1 PLANTAS TOLERANTES AL FRÍO

La tolerancia es la capacidad que presentan algunas plantas para compensar o soportar un factor estresante, ya sea biótico o abiótico, con un mínimo nivel de daño en su funcionalidad (Agrawal *et al.*, 2004). Las plantas tolerantes al frío son originarias de climas templados, donde la temperatura cambia de forma gradual y específica para cada estación, registrando de acuerdo con la región geográfica descensos por debajo de los 0 °C hasta -30 °C para el invierno. Las plantas que crecen bajo estas condiciones han desarrollado estrategias para garantizar su sobrevivencia, principalmente vía aclimatación al frío (Solanke y Sharma, 2008). Entre las especies cultivadas tolerantes al frío destacan algunas variedades de cebolla, espárrago, nabo y col (Mainardi *et al.*, 2013).

Efecto de la aclimatación sobre el cloroplasto y fotosíntesis

El proceso de aclimatación involucra diferentes cambios en el metabolismo de las plantas (Guo *et al.*, 2018). En la fotosíntesis, la velocidad de las reacciones enzimáticas se afecta por el descenso de la temperatura (Azcón-Bieto y Talón, 2008); sin embargo, las plantas de climas templados han desarrollado estrategias para adaptarse a la disminución de la temperatura ajustando su capacidad fotosintética (Hurry y Huner, 1991; Solanke y Sharma, 2008). Durante la aclimatación al frío, las plantas tolerantes logran mantener el equilibrio entre la energía luminosa captada respecto a la que pueden asimilar (Ensminger *et al.*, 2006), es decir, son capaces de protegerse contra la fotoinhibición a bajas temperaturas, ya que en esta condición, las plantas suelen ser más susceptibles a sufrir daño por la luz (Hetherington *et al.*, 1989; Solanke y Sharma, 2008; Theocharis *et al.*, 2012). El hecho de ser plantas tolerantes al frío no las exonera de ser vulnerado el funcionamiento de los fotosistemas I y II (PSI, PSII) ante condiciones estresantes, especialmente cuando a ello se suma una elevada exposición lumínica (Tjus *et al.*, 1998).

La estrecha relación entre fotosistemas implica que el fallo de uno de ellos termina por afectar al otro, principalmente por dañar la capacidad de absorción de energía lumínica con afectación directa en la cadena de transporte de electrones (Tjus *et*

al., 1998). Esto se relaciona con la viscosidad de la membrana del tilacoide que aumenta durante la baja temperatura y disminuye la movilidad de la plastocianina entre los sacos tilacoidales, afectando la transferencia de electrones provenientes del PSII con destino al PSI durante la fase luminosa de la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2006; Ruelland *et al.*, 2009).

Durante la aclimatación al frío, las células vegetales aminoran la actividad del PSII a fin de reducir el flujo de electrones, y que el aceptor de electrones del PSI, el NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), no se sature, con ello también se prevé un daño irreparable del PSI, ya que es el fotosistema más sensible al frío (Huang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). Al mismo tiempo, durante el periodo de aclimatación es necesaria la constante biosíntesis de las proteínas fotosintéticas para compensar el daño en fotosistemas ocasionado por el estrés oxidativo que desencadena el frío (Liu *et al.*, 2018; Bilyavska *et al.*, 2019).

Las plantas capaces de aclimatarse logran disipar el exceso de energía luminosa absorbida y evitan que el aparato fotosintético se afecte a través del incremento de plastoquinonas en la membrana tilacoidal, durante la fase luminosa de la fotosíntesis (Theocharis *et al.*, 2012) asegurando el correcto transporte de electrones entre los fotosistemas (Ensminger *et al.*, 2006). A su vez, se aumenta la cantidad de pigmentos, como las zeaxantinas y carotenoides, las cuales contribuyen absorbiendo fotones y liberando su energía en forma de calor (Azcón-Bieto y Talon, 2008; Theocharis *et al.*, 2012).

Adicionalmente, ocurren cambios morfológicos en el cloroplasto, se incrementa su tamaño, y se promueve la formación de estrómulos, prolongaciones del organelo que contienen en su interior sólo estroma sin tilacoides. De acuerdo con Bilyavska *et al.* (2019) ambos cambios tienen el propósito de cubrir una mayor superficie de intercambio celular, el mayor acercamiento hacia mitocondrias, núcleo, retículo endoplasmático y membrana plasmática, logrando una efectiva depuración de compuestos tóxicos generados durante el estrés por frío, así como el reciclaje de nutrimentos.

Efecto de la aclimatación sobre la composición lipídica de las membranas celulares

Para que la aclimatación sea exitosa se requiere que la planta reajuste su estructura celular mediante la composición lipídica y así evitar la formación de cristales de hielo en los líquidos celulares y que ocurra una expansión del citoplasma que lleve a una ruptura membranal (Hou *et al.*, 2016). La mayoría de las plantas sometidas a un proceso previo de aclimatación aumentan significativamente su composición de lípidos, especialmente los ácidos grasos insaturados ocasionando que el acomodo en la bicapa lipídica sea más fluido (Hou *et al.*, 2016). Para ello, se incrementa la actividad de las enzimas desaturasas de ácidos grasos cuya función implica remover átomos de hidrogeno para promover enlaces dobles entre los carbonos de los ácidos grasos pertenecientes a estructuras celulares de importancia como las membranas de cloroplastos y tilacoides (Murata y Wada, 1995; Ruelland y Zachowski, 2010; He *et al.*, 2020).

Se han evaluado diversas desaturasas inducibles por frío en plantas transformadas expuestas a procesos de aclimatación, que han revelado un incremento en la tolerancia ante el estrés por frío entre las que se encuentran plantas de *Oryza sativa* (ω -6 desaturasa), *Arabidopsis thaliana* (ω -3 desaturasa) y *Brassica napus* (estearoil ACP desaturasa) demostrando una mayor insaturación de sus componentes lipídicos, indicando que el grado de expresión de las desaturasas está altamente relacionado con el proceso de aclimatación al frío (Kazemi-Shahandashti *et al.*, 2013; He *et al.*, 2020).

Efecto de la aclimatación sobre los azúcares

Durante la aclimatación ante el frío, las plantas acumulan azúcares solubles con el propósito de actuar como osmoprotectores que le ayuden a la célula a mantener su balance hídrico y, por lo tanto, la turgencia celular. La eficiencia de la protección de azúcares ha sido probada con aplicaciones exógenas de glucosa y sacarosa, mostrando resultados positivos en la tolerancia al frío en col y alcachofa (Harris *et al.*, 2004).

El estudio de plantas mutantes *sfr-1* (sensitivity to freezing) de *Arabidopsis thaliana*, alteradas en su tolerancia ante el frío demuestra una tendencia a la mayor acumulación de glucosa, sacarosa, rafinosa y fructosa, relacionada con mayores tasas de sobrevivencia ante estrés por frío respecto a las tipo silvestre (Thorlby *et al.*, 2004; Yuanyuan *et al.*, 2009).

Es posible que la protección contra el daño por frío se explique gracias a la función osmoprotectora de los azúcares acumulados que al interactuar con la bicapa lipídica, la protegen de la deshidratación excesiva a fin de mantener la estabilidad y fluidez membranal. Sumado a ello, los azúcares acumulados son un recurso de mantenimiento para la planta al ser fuente de nutrientes durante y después del estrés, en la fase de recuperación cuando la temperatura vuelve a ser cálida (Yuanyuan *et al.*, 2009).

Efecto de la aclimatación sobre la señalización de las células vegetales

La señalización en las células vegetales logra importantes respuestas para la vida de las plantas. Para que las plantas desarrollen tolerancia al frío se necesita de la transducción de señales que involucra proteínas receptoras inmersas en la membrana plasmática que inicialmente perciben el estímulo y desencadenan una serie de señales y respuestas corriente abajo. El Ca^{2+} actúa como segundo mensajero transitorio, cuando la temperatura disminuye y aumenta la rigidez de la membrana, entonces se activan canales especiales para que el Ca^{2+} se transporte con mayor rapidez al interior de la célula (Tuteja y Sopory, 2008). El mensaje es recibido por sensores, como calmodulina (CaM), que cambian su conformación proteica al unirse con el Ca^{2+} , formando una estructura globular compacta que envuelve a una proteína blanco, como pueden ser cinasas, factores de transcripción o canales iónicos, que amplifican la transducción de señales hacia el interior de la célula, influyendo en la inducción de fitohormonas tales como el ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico (SA) y el jasmónico (JA) (Ku *et al.*, 2018). Otras proteínas, como las cinasas dependientes de Ca^{2+} (CPK), desencadenan vías de señalización que involucran otras moléculas; por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno (ROS), que a su vez actúan también como segundos mensajeros (Hou *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2018).

Las cascadas de proteínas dependientes de la CaM y proteínas similares a ellas (CML), continúan con el proceso de señalización corriente abajo (Guo *et al.*, 2018), el contenido iónico de la célula cambia y ocurren modificaciones de otras proteínas; la suma de estos eventos promueven que el mensaje logre llegar hasta el núcleo y con ello obtener la expresión génica, que eventualmente permite a la planta incrementar su tolerancia al frío (Örvar *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2018).

Como se mencionó anteriormente, algunas fitohormonas están involucradas en la aclimatación al frío (Xue-Xuan *et al.*, 2010; Barrero-Gil *et al.*, 2016). El ABA, el JA y las giberelinas (GA) están relacionadas, entre otras funciones, con un efecto protector o inductor de la tolerancia al frío (Akula y Ravishankar, 2011). La síntesis del ABA incrementa en plantas de *A. thaliana* en proceso de aclimatación al frío y su aplicación exógena induce tolerancia al frío (Peleg y Blumwald, 2011; Khan *et al.*, 2015). El ABA fácilmente se transporta vía xilema y floema por toda la planta, convirtiéndolo en un mensajero ideal, por lo que se reconoce como inductor de expresión de genes relacionados con la respuesta al frío, como *erd* (early responsive to dehydration) cuyos productos presentan funciones bioquímicas diversas, entre las que resalta SpERD15 en *Solanum pennellii*, la cual, mediante acumulación de azúcares solubles y prolina, además de lograr tolerancia al frío, incide en una menor peroxidación de lípidos (Xue-Xuan *et al.*, 2010; Ziaf *et al.*, 2011).

La naturaleza sensible de los estomas los hace responder en función de los estímulos del exterior. La disminución de temperatura en las células guarda de los estomas inhiben la apertura del estoma y provoca su cierre en plantas de *A. thaliana* (Agurla *et al.*, 2018). Esta respuesta de cierre se complementa en plantas de climas templados con el incremento gradual del ABA durante la aclimatación al frío induciendo el cierre estomático como un mecanismo de modulación del estado iónico de las células (Lee y Luan, 2012; Agurla *et al.*, 2018), atendiendo a la baja tasa de absorción del agua, ya que la transpiración se encuentra en un estado prácticamente estático bajo tal condición.

Por su parte, los jasmonatos derivados de ácido α -linolénico, desempeñan un rol protector en episodios de estrés principalmente cuando se genera una herida en el

tejido vegetal, por ejemplo, herbivoría o daño mecánico por factores abióticos, actuando en ambos casos como una señal sistémica que interactúa con el metabolismo de moléculas de defensa (Larrieu y Vernoux, 2016). En plantas de *A. thaliana* y de arroz expuestas a frío, cuando se les aplica JA de manera exógena, éste influye en el contenido de moléculas antioxidantes, como antocianinas y glutatión, tanto en la etapa previa de aclimatación como en plantas sin aclimatación, reduciendo así los efectos negativos derivados del estrés oxidante causado por frío (Hu *et al.*, 2017; Ku *et al.*, 2018).

En cuanto a la modulación del crecimiento durante eventos de estrés abiótico, entre ellos inundación y frío, resaltan las GA. Una producción baja de GA logra disminuir el crecimiento celular con el objetivo de que la planta concentre sus recursos en sobrevivir al estrés dejando en segundo plano el aumento de tamaño (Colebrook *et al.*, 2014).

1.1.1.2 PLANTAS NO TOLERANTES AL FRÍO

El frío es uno de los factores de estrés abiótico que afectan a las plantas de origen tropical y subtropical (Ruelland *et al.*, 2009). Entre las plantas de interés agrícola más sensibles al estrés por frío se encuentran el pimiento, la papa y el jitomate. En estas plantas el descenso de la temperatura por debajo de los 10-15 °C provoca un desequilibrio en su desarrollo. Los efectos visibles son clorosis en el tejido foliar, menor crecimiento en altura y escaso desarrollo de hojas (Barrero-Gil *et al.*, 2016; Elkelish *et al.*, 2020).

La exposición de las plantas no tolerantes a bajas temperaturas puede tener efectos transitorios; sin embargo, si la duración de la exposición extrema se prolonga, ésta causa rigidez de las membranas y formación de hielo en los líquidos celulares. La expansión provoca la disrupción de las membranas celulares que, incapaces de contener los fluidos, conllevan a la deshidratación y muerte de las plantas (Miura y Tada, 2014).

La inducción de rigidez de las membranas en plantas no tolerantes al frío conlleva a una alteración de los procesos relacionados con ella, como la apertura de canales iónicos, reacciones de transferencia de electrones asociadas a la

membrana y la acumulación de ROS (Ruelland *et al.*, 2009; Barrero-Gil *et al.*, 2016).

Las ROS son formas parcialmente reducidas o excitadas del oxígeno atmosférico (O_2), sus reducciones parciales generan aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 y radicales hidroxilo (OH^{\cdot}). Su formación es natural durante los procesos metabólicos de la célula vegetal (Garg y Manchanda 2009; Demidchik, 2014; Zehra, 2017); sin embargo, en episodios de estrés biótico y abiótico, como en el caso del frío, la producción de ROS se eleva a tal punto que su concentración sobrepasa la capacidad de modulación por parte de las enzimas antioxidantes. El resultado es dañino para las células (Tripathy y Oelmüller, 2012), pues las ROS promueven la pérdida de electrones de moléculas esenciales para la vida de la célula vegetal: pigmentos, proteínas, lípidos, DNA y RNA (Mittler, 2016).

La cinética de las reacciones metabólicas también se ven ralentizadas, afectando la actividad de las enzimas antioxidantes involucradas en contrarrestar los niveles de ROS en los compartimentos celulares (Ruelland *et al.*, 2009; Barrero-Gil *et al.*, 2016).

La peroxidación de lípidos de la membrana celular indica la primera evidencia del estrés por frío y puede ocurrir a consecuencia de una elevada concentración de ROS, que afecta su composición y estabilidad, el nivel de lesión está directamente relacionado con el tiempo de exposición del estrés por frío (Aydin *et al.*, 2013).

1.2 ESTRÉS BIÓTICO

El estrés biótico es ocasionado por el cambio de las relaciones ecológicas entre los organismos. Las plantas, al interactuar con diversos organismos pueden verse afectadas de alguna manera en su desarrollo. Por ejemplo, las plantas constantemente compiten entre ellas por el espacio en suelo, iluminación y acceso a nutrientes (Idárraga, 2009); algunos insectos afectan el desarrollo de las plantas al alimentarse de ellas, ya sea por succión de la savia o por herbivoría (Linares *et al.*, 2020); y diversos patógenos, como hongos, bacterias y virus, cuyo propósito es desarrollarse y reproducirse sobre o dentro de los tejidos de las plantas, causan

enfermedades que en casos graves de infección, provocan la muerte de la planta hospedera (Madriz-Ordeñana, 2002; Agrios, 2013).

Las plantas han desarrollado estrategias de defensa ante las interacciones de estrés biótico. En el caso de la interferencia del desarrollo entre plantas, es recurrente la exudación de compuestos alelopáticos que inhiben o disminuyen la germinación o crecimiento de plantas en el perímetro de crecimiento de las plantas que emiten dichos compuestos (Blanco, 2006). Respecto al ataque de insectos o patógenos, las plantas desarrollan defensas constitutivas e inducidas para contrarrestar la invasión.

Las defensas constitutivas son propias del tejido epidérmico vegetal, varían en cada especie y pueden ser ceras, tricomas, o pared celular rica en lignina. El objetivo es servir de barrera física ante invasores, y se complementan con la secreción de compuestos químicos que repelen, disminuyen o inhiben el daño provocado por dichos agentes (Agrios, 2013). Por su parte, la defensa inducida incluye cambios morfológicos tras el contacto con el agente invasor, resultando en una interacción activa para generar un límite físico entre la zona infectada respecto al tejido sano que limite el avance de la invasión. Un ejemplo de esto son las capas de abscisión y la excreción de gomas, que comprende además la biosíntesis de compuestos químicos como respuesta de defensa (Agrios, 2013).

Las respuestas de las plantas ante el estrés biótico que provoca enfermedades suelen diferenciarse entre locales o sistémicas. La respuesta local indica que la defensa desarrollada por la planta se limitará al sitio de contacto con el agente estresante. En patógenos de origen fúngico destaca el desarrollo de capas de abscisión que limitan el avance del patógeno, aislándolo y matándolo por la falta de nutrientes y por la presencia de sustancias antimicrobianas, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Madriz-Ordeñana, 2002; Agrios, 2013). La respuesta sistémica se comprende como una amplificación del estímulo estresante que provoca un estado de alerta general en toda la planta (Vivanco *et al.*, 2005).

El estado de alerta de la respuesta sistémica puede ser adquirida o inducida. El primer término hace referencia que tras sobrevivir a una enfermedad, la planta

adquiere un estado de inmunidad frente a futuros agentes patógenos que compartan el mecanismo de infección, frecuentemente patógenos que provocan necrosis en el tejido vegetal (Conrath, 2006; Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007). El segundo término involucra una activación de las defensas cuando la planta entra en contacto con un microorganismo avirulento, por ejemplo rizobacterias y hongos micorrizos, donde su interacción simbiótica logra activar la respuesta de defensa en la planta (Ramírez y Rodríguez, 2012).

De acuerdo con la Encuesta Nacional Agropecuaria (INEGI, 2019), el impacto del estrés biótico, en términos de unidades de producción agrícola generó pérdidas del 48% en el año 2019 a nivel nacional, la mayor afectación corresponde a plagas, seguido de la incidencia de enfermedades; la mayoría de los casos registrados presentaron ambas afectaciones.

2. EL HONGO *TRICHODERMA* SPP. EN LA AGRICULTURA

El hongo *Trichoderma* spp. pertenece al grupo de Ascomycetes. Como características morfológicas “presenta micelio septado, conidias generalmente ovaladas, conidióforo hialino no verticilado, fiálides singulares o en grupos y conidias coloreadas de verde oscuro” (Chávez, 2006).

Es un hongo anaerobio facultativo que presenta abundante esporulación y rápido crecimiento en papa dextrosa agar (PDA), además presenta alta eficiencia para establecerse en diversos tipos de suelo, la cual se relaciona con su capacidad de acondicionar la rizósfera a su beneficio. *Trichoderma* spp. tiene mayor éxito cuando crece en medios ácidos (Benítez *et al.*, 2004); esto explica la secreción de ácidos orgánicos (ácido fumárico, glucónico y cítrico), que se detectan durante su crecimiento. Sumado a ello se reconoce a este hongo por mejorar la disponibilidad de gran parte de los nutrientes para las raíces de las plantas. De esa manera, *Trichoderma* spp. posee un punto a su favor para hacer simbiosis con diversas especies vegetales que aprovechan dicha característica; por su parte, el hongo se establece en la rizósfera y recibe exudados de la raíz provenientes de la actividad fotosintética (Benítez *et al.*, 2004; Hermosa *et al.*, 2012).

La habilidad de *Trichoderma* spp. de establecer simbiosis con las raíces e incrementar el crecimiento de las plantas es un factor del éxito al inocular plantas de interés agrícola, ya que se han reportado diversos efectos positivos, entre ellos: el control de agentes patógenos de carácter fúngico, cambios en la microflora que conlleva a mejorar la disposición de nutrientes en la solución del suelo, así como la solubilización de nutrientes (Harman, 2006).

Cabe resaltar que entre las principales ventajas de *Trichoderma* spp. son: su alta ubicuidad, alta capacidad de reproductiva, eficiencia para utilizar nutrientes y habilidad para colonizar el suelo incluso en condiciones desfavorables (Benítez *et al.*, 2004). La forma de aplicación de *Trichoderma* spp. es variada, ya que puede asperjarse en la semilla, distribuirse en el sistema de fertirriego, por sumersión del cepellón de plántulas en solución acuosa, así como en formulaciones granuladas o por aspersión foliar (Bocourt *et al.*, 2013).

El estilo de vida de *Trichoderma* spp. como simbionte avirulento de plantas superiores ha promovido su éxito como especie, no sólo por brindar protección contra patógenos y estímulo del crecimiento vegetal, sino también por contribuir a la tolerancia ante diferentes tipos de estrés abiótico (Benítez *et al.*, 2004; Harman, 2006).

2.1 INTERACCIÓN PLANTA-HONGO E INDUCCIÓN DE TOLERANCIA AL ESTRÉS BIÓTICO

En términos generales, la interacción del hongo *Trichoderma* spp. con la planta hospedera cumple el siguiente orden: reconocimiento, unión, penetración, colonización y, por último, transferencia de nutrientes (Hidangmayum y Dwivedi, 2018). Durante la relación que *Trichoderma* spp. establece con las raíces de las plantas, se desenvuelve como simbionte avirulento, es decir, no causa enfermedad a la especie vegetal, pero sí estimula la activación del sistema de defensa de la planta. De esta manera, *Trichoderma* spp. induce en las plantas protección contra estrés de tipo biótico y abiótico y, a cambio, *Trichoderma* spp. recibe nutrientes exudados de la raíz (Herrera-Téllez *et al.*, 2019).

El mecanismo por el cual *Trichoderma* spp. se adhiere a las raíces de las plantas se asemeja al micoparasitismo porque la penetración hacia el tejido radicular es posible gracias a estructuras similares a apresorios, donde el reconocimiento y la adhesión de *Trichoderma* spp. con su planta hospedera, durante su asociación simbiótica, es mediada por hidrofobinas, proteínas que se encuentran en la capa externa que recubre la superficie celular fúngica (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016). En *T. asperellum*, la hidrofobina TasHyd1 mejora la fijación a la superficie de la raíz, al tiempo que las puntas hifales se protegen de los compuestos de defensa vegetal al secretar enzimas celulolíticas y proteolíticas, haciendo efectiva la penetración de la raíz (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Viterbo y Chet 2006).

Durante la interacción, la planta inoculada recibe inmunidad frente a diversos tipos de patógenos a través de la respuesta sistémica inducida por *Trichoderma* (TISR, por sus siglas en inglés: *Trichoderma* induce systemic resistance). Martínez-Medina *et al.* (2013) investigaron las respuestas de las plantas mutantes que

sobreexpresan a la prosistemina (precursor del JA) contra el patógeno *Botrytis cinerea*. Sus resultados revelan que el desarrollo de la enfermedad es significativamente afectada por la interacción con *T. harzianum*, indicando que la vía del JA es vital para que la TISR sea efectiva.

La TISR es posible gracias a que, desde el primer contacto de la planta con el hongo, *Trichoderma* spp. comienza una invasión asintomática que obliga a la planta a activar su sistema de defensas. Inicia con el refuerzo de su pared vegetal, acumulación de compuestos microbianos y producción de ROS (Martínez-Medina *et al.*, 2013). *Trichoderma* spp. también logra activar una red hormonal donde el JA, el etileno (ET) y el ABA están presentes para la protección sistémica de la planta (Martínez-Medina *et al.*, 2014).

Lo anterior concuerda con otro reporte en el que al analizar la respuesta sistémica por *T. virens* tras la infección con *Fusarium oxysporum* se identificaron las vías de señalización asociadas al SA o al JA (Jogaiah *et al.*, 2018). Plantas de jitomate mutantes, deficientes en SA o JA, fueron inoculadas con *T. virens* y, posteriormente, al ser retadas con el agente patógeno, mostraron un alto nivel de susceptibilidad ante la enfermedad; por el contrario, las plantas de tipo silvestre, reportaron la activación del gen *PR1a* inducido por SA, por lo tanto, provocó una respuesta sistémica adquirida, y también se activó el gen de defensa *PDF1*, inducido por JA, es decir una respuesta sistémica inducida. Por esta razón, se concluye que la capacidad de *T. virens* para desencadenar respuestas de defensa vegetal está fuertemente vinculada con la capacidad de síntesis del JA y del SA en las plantas inoculadas (Jogaiah *et al.*, 2018).

Esto es importante porque *Trichoderma* spp. no sólo mejora el desarrollo de las plantas y combate ataques de patógenos directamente, sino que también su interacción con la planta ocasiona un balance importante en la regulación hormonal de la planta como medida clave para hacer frente a situaciones de estrés, ya que no sólo se trata de aumentar el nivel de las fitohormonas, sino de mantener el equilibrio que debe existir entre ellas, como el ácido indol-3-acético, el SA, el JA, el ABA, las auxinas y las citocininas, a disposición de los requerimientos de la planta (Martínez-Medina *et al.*, 2013).

El cultivo de jitomate como planta de clima subtropical es sensible al frío (Khan *et al.*, 2015). Debido a su importancia económica, varias investigaciones están orientadas hacia la comprensión del efecto del frío sobre las diversas etapas fenológicas del cultivo (Mastouri *et al.*, 2010; Barrero-Gil *et al.*, 2016; Subramanian *et al.*, 2016; Atayee y Noori, 2020). Las evidencias coinciden en que el estrés por frío afecta el crecimiento normal de las plantas de jitomate, reduce la fluidez de la membrana celular provocando que las células sean más propensas a la disrupción celular, deshidratación, fuga de electrolitos, y daño en la estructura celular de organelos asociados a procesos fisiológicos esenciales (Khan *et al.*, 2015; Subramanian *et al.*, 2016; Ntatsi *et al.*, 2017). Las plantas de jitomate llegan a presentar síntomas severos de marchitez y en última instancia la planta muere.

A diferencia de las plantas tolerantes al frío, las plantas de jitomate no poseen la misma capacidad de llevar a cabo la aclimatación al frío en su sitio de establecimiento, por ello y en la búsqueda por comprender los mecanismos que orquestan la inducción a la tolerancia al frío, Barrero-Gil *et al.* (2016) trabajaron con plantas de jitomate preincubadas a 10 °C para posteriormente exponerlas a frío (4 °C) por tiempos más prolongados. Los resultados revelaron que la previa incubación promovió la sobrevivencia de las plantas después de la exposición al estrés por frío. Los autores refieren que este efecto se relaciona con la acumulación de azúcares y cambios en la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la síntesis de fitohormonas, especialmente ABA, JA y GA, además se asoció con el incremento de flavonoides y antocianinas como agentes antioxidantes que evitan el daño de la fotoinhibición en los fotosistemas.

Durante los últimos años se ha profundizado sobre el estudio de microorganismos benéficos con potencial para aliviar o disminuir los efectos del estrés por frío en plantas de jitomate. Ejemplo de ello es la bacteria *Pseudomonas sp.*, la cual induce tolerancia al frío en plántulas de jitomate (Subramanian *et al.*, 2016). Entre los principales resultados se destaca la ganancia en la biomasa de las plantas inoculadas con la bacteria comparada con los controles, aún bajo estrés por frío. Los autores atribuyen el efecto a una mayor toma de nutrientes. Por otro lado, se

reporta un menor daño en las membranas de las plantas inoculadas con *Pseudomonas* asociándolo a una menor peroxidación de lípidos por una baja presencia de ROS (Subramanian *et al.*, 2016).

Otro microorganismo usado para disminuir el efecto negativo de algunos tipos de estrés sobre las plantas es el hongo *Trichoderma* spp. Específicamente, *T. harzianum* ha sido evaluado sobre semillas de *Lycopersicon esculentum* sometidas a estrés por frío. Mastouri *et al.* (2010) evaluaron la germinación, tamaño de radícula e hipocótilo así como el daño oxidativo a nivel membranaral tras la exposición al estrés por frío a 10 °C. Sus resultados revelan que el tratamiento con *T. harzianum* mejora la germinación durante el estrés por frío y que reduce significativamente la peroxidación de lípidos en membranas de plántulas expuestas a dicho estrés.

Trichoderma spp. es capaz de soportar ambientes hostiles al adaptar su metabolismo y activar su sistema de defensa. Está reportado que cuando *T. asperellum* se expone a estrés por frío a 4 °C, o calor a 38 °C, no presenta dificultades para su desarrollo y crecimiento (Mota *et al.*, 2019). Sumado a ello, al evaluar su capacidad como agente de biocontrol sobre fitopatógenos (*Botrytis* y *Sclerotinias*), se reporta que no se ve mermada bajo ninguno de los niveles de estrés térmico, esto gracias a la activación de proteínas de choque térmico Hsp (por su abreviación del inglés Heat shock proteins) que se expresan rápidamente (Mota *et al.*, 2019).

El efecto de *Trichoderma* spp. en la atenuación de la respuesta de plantas bajo estrés salino también ha sido explorado. Zhang *et al.* (2016) reportan que *T. logibranchiatum* es capaz de colonizar las raíces de las plantas incluso cuando se encuentran expuestas a este tipo de estrés abiótico. La inoculación aumentó significativamente la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y catalasa (CAT), induciendo la tolerancia a salinidad a nivel fisiológico y molecular debido a la expresión de estos genes que codifican dichas enzimas antioxidantes.

En el mismo orden de ideas, en otro estudio se inocularon plantas de maíz con *T. asperellum* y tras exponer las plantas a estrés salino y alcalino, se incrementó el contenido de azúcares solubles y prolina tanto en hojas como en raíces (Fu *et al.*, 2017). Esto es relevante porque son elementos necesarios para que las células de las plantas bajo estrés no se deshidraten. Sumado a ello, las plantas inoculadas mostraron actividad enzimática significativamente mayor de SOD, glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y ascorbato peroxidasa (APx) respecto a las plantas de maíz no inoculadas (Fu *et al.*, 2017).

El estrés biótico y abiótico en plantas tienen un punto en común: la elevada producción de ROS, que resulta tóxica para las células que las producen. La implementación de soluciones para paliar este efecto es cada vez mayor con agentes bioinoculantes. Por ejemplo, la inoculación de *T. asperellum* en plantas de jitomate contribuye a una menor producción de ROS tras someterlas a dos agentes patógenos que provocan su producción, por un lado *Fusarium oxysporum* y también *Botrytis cinerea*, concluyendo que en ambos casos el daño ocasionado por la infección, así como la producción de ROS fue significativamente menor a las observadas en plantas sin inocular que presentaron signos graves de ambas enfermedades (Herrera-Téllez *et al.*, 2019).

Gran parte de los problemas medioambientales tienen su origen en el uso indiscriminado de agroquímicos, fertilizantes y pesticidas bajo la premisa de una mayor producción de alimentos. La agricultura necesita avanzar con cambios en el manejo agronómico de plagas, enfermedades y fertilización inclinándose hacia la agricultura sustentable, donde el uso de microorganismos benéficos en la agricultura, tales como el hongo *Trichoderma* spp., sean empleados por su efectividad en la simbiosis con las plantas al mejorar su desarrollo, defensa vegetal y respuesta ante estrés biótico y abiótico (Singh *et al.*, 2017).

El jitomate es un cultivo de carácter local e internacional por la elevada demanda en su consumo. En México la producción de jitomate para el año agrícola 2020 alcanzó 3 370 826 toneladas, con las que logro satisfacer el consumo nacional así como también contribuir a demanda internacional, colocando a nuestro país como el noveno productor mundial de este fruto; por lo que su cultivo implica beneficio social y económico para miles de productores agrícolas (SIAP, 2020; INEGI, 2019).

Sin embargo, el rendimiento del cultivo de jitomate presenta pérdidas atribuidas a factores bióticos y abióticos que disminuyen su rentabilidad (Ruelland *et al.*, 2009).

En 2017, la Encuesta Nacional Agropecuaria reportó pérdidas del 74.7 % de unidades de producción por causas climáticas, de las cuales el 13.5 % fue por bajas temperaturas (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2017). Y tan sólo dos años después, las pérdidas fueron del 85 %, de las cuales, el 32 % correspondió al descenso de la temperatura (INEGI, 2019).

Aumentar la tolerancia a bajas temperaturas podría reducir considerablemente las pérdidas de cultivos de jitomate a campo abierto y, por otro lado, reducir el costo de energía consumida en invernaderos con calefacción (Ntatsi, 2017).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *T. asperellum* sobre la tolerancia al frío de plantas de *S. lycopersicum* con y sin previa aclimatación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el efecto *T. asperellum* sobre el fenotipo de plantas de *S. lycopersicum* durante el estrés por frío con y sin previa aclimatación al frío.
- Analizar el efecto de la inoculación del hongo *T. asperellum* durante el estrés por frío en plantas de *S. lycopersicum* con y sin previa aclimatación al frío, mediante la evaluación del índice de crecimiento, el diámetro del tallo, el desarrollo foliar, la longitud de la raíz, la biomasa y el contenido de clorofila.
- Evaluar el efecto de *T. asperellum* sobre la integridad celular de las plantas de estudio bajo estrés por frío a través de la medición de fuga de electrolitos.

La inoculación con *T. asperellum* atenúa el daño de las plantas de jitomate ante estrés por frío sin recurrir a un proceso previo de aclimatación al frío.

1. UBICACIÓN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología y Plagas e invernaderos del Instituto de Ciencias Agropecuarias, UAEH. En Avenida Universidad Km 1 s/n Rancho Universitario, Antigua Hacienda Aquetzalpa, C.P 43600 Tulancingo de Bravo, Hidalgo. Cuyas coordenadas geográficas corresponden a 20° 03' 47.1" de latitud Norte y 98° 22' 53.5" de longitud Oeste.

1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron semillas de jitomate tipo Saladette, marca Hortaflores. De acuerdo a las especificaciones de la etiqueta, las semillas presentan 92% de viabilidad y 99% de pureza física.

Para la inoculación de las plantas de jitomate se empleó la cepa de *T. asperellum* conservada en el laboratorio de investigación.

1.2 GERMINACIÓN DE JITOMATE

El sustrato consistió en una mezcla peat moss y vermiculita en una relación 7:3 (v/v). La mezcla se hidrató a capacidad de campo y con ella se llenó la charola previamente desinfectada. Se colocó una semilla de jitomate por cavidad y se cubrió cuidadosamente con una capa fina del mismo sustrato. La charola se conservó a temperatura ambiente.

1.3 OBTENCIÓN DE CONIDIOS DE *T. ASPERELLUM*

La cepa de *T. asperellum* se sembró en medio papa dextrosa agar (PDA; 39 g/l). Una vez invadido el medio de cultivo por *T. asperellum*, se obtuvo el inóculo fúngico (10^5 conidios/ ml) para ser llevado a sustrato sólido (compuesto por hojuelas de avena, caolín y vermiculita), de acuerdo con Herrera (2018).

1.4 TRASPLANTE DE JITOMATE E INOCULACIÓN CON *T. ASPERELLUM*

A la mezcla de sustrato peat moss y vermiculita se le adicionó 10% de la formulación sólida no inoculada, se regó a capacidad de campo y se utilizó para el llenado de las macetas plásticas para el trasplante de las plantas de jitomate de

tres semanas de edad, designadas “plantas no inoculadas”. A la par, se añadió la formulación sólida previamente inoculada con *T. asperellum* a una mezcla de sustrato, y se usó para el trasplante de las plantas de jitomate, designadas “inoculadas”. Las plantas fueron llevadas al invernadero, el riego se realizó diariamente con 80 ml de solución nutritiva, compuesta por nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre adaptando los niveles óptimos de fertilización en sustrato para plantas de jitomate recomendados por Escobar y Lee (2009), siempre comenzando el riego de las plantas control. Al término de tres semanas posteriores al trasplante, las plantas se utilizaron para la aplicación de tratamiento por frío.

1.5 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS

Las plantas con y sin inoculación fueron arregladas aleatoriamente en tres grupos, cada grupo conformado por seis plantas de jitomate. El primer grupo, designado control, correspondió a plantas \pm *T. asperellum*, cuyo crecimiento ocurrió en condiciones bajo invernadero. Un segundo grupo, constituido por plantas \pm *T. asperellum* aclimatadas, constaba de plantas que fueron llevadas a 10 °C por 4 días, para posteriormente exponerlas a frío (4 °C) durante 12 días; y finalmente, el tercer grupo, plantas \pm *T. asperellum* no aclimatadas, corresponden a aquellas expuestas directamente a frío (4 °C) durante 12 días (Figura 1).

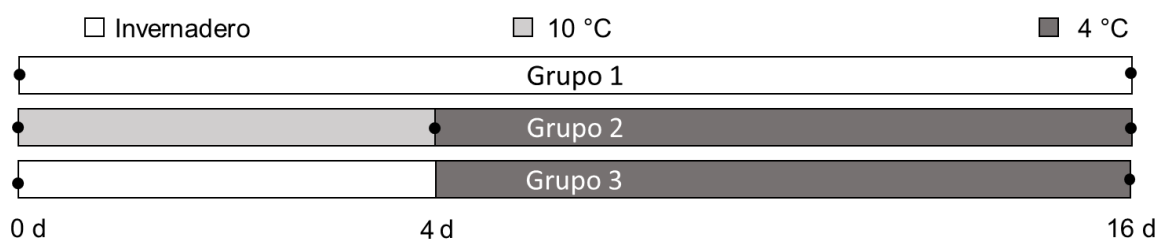


Figura 1. Grupos de tratamientos en plantas de *S. lycopersicum*. El tiempo cero indica tres semanas posteriores al trasplante \pm *T. asperellum*. Los puntos indican los tiempos en que se realizaron las mediciones descritas en la metodología.

1.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *T. ASPERELLUM*

Se evaluó el crecimiento de las plantas \pm *T. asperellum* de acuerdo con los siguientes parámetros agronómicos:

- a) Índice de crecimiento: calculado a partir de la altura de la planta, en centímetros, desde el cuello de la planta hasta la punta del foliolo más largo, durante el periodo evaluado.
- b) Diámetro de tallo: medido en milímetros, colocando el Vernier justo sobre el crecimiento de los cotiledones.
- c) Número de hojas: se contaron únicamente hojas verdaderas completamente desarrolladas.
- d) Área foliar: Se fotografió la segunda hoja verdadera de cada planta para posteriormente analizar las imágenes con el Software ImageJ.
- e) Longitud de raíz: desde el cuello de la planta hasta la punta de tres raíces finales (en centímetros).
- f) Contenido relativo de clorofila: se realizaron tres registros con el sensor SPAD en folíolos aleatorios a fin de obtener un promedio de registro por cada planta.
- g) Biomasa: expresado en gramos a partir del peso seco del follaje al final del experimento.

1.7 PORCENTAJE DE FUGA DE ELECTROLITOS

Se evaluó la permeabilidad de las membranas en las plantas \pm *T. asperellum* durante cada tratamiento térmico, adaptando la metodología previamente descrita (Rolny *et al.*, 2011). Se tomaron de cada planta por condición 25 discos de tejido vegetal, se sumergieron en 15 ml de agua destilada y se registró la conductividad eléctrica inicial (CE_0). Posteriormente, las muestras se colocaron en agitador orbital por 3 h a 200 rpm y se obtuvo la segunda lectura (CE_2). Por último, para la extracción total de electrolitos (TC), las muestras se colocaron a ebullición durante 30 min. El porcentaje de fuga de electrolitos se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fuga de electrolitos} = \frac{CE_2 - CE_0}{TC} * 100$$

1. 8 EXTRACCIÓN DE CLOROFILAS

El contenido de clorofila a, b y c de cada muestra se obtuvo por espectrometría con el método empleado por Parsons y Stickland (1963), donde para cada condición se tomaron 2 g de tejido vegetal libre de venas mayores. Cada muestra se homogenizó con 10 ml de acetona al 90 % en obscuridad y sobre hielo. Los extractos se conservaron en refrigeración (4 °C) por 24 h. Posteriormente, se midió la densidad óptica (DO) del sobrenadante de cada muestra diluida con acetona (200 µl sobrenadante: 1800µl acetona al 90%). Para la cuantificación de cada clorofila se emplearon las siguientes formulas:

$$\text{Clorofila a (mg Al}^{-1}\text{)} = 11.6 (DO\ 665) - 1.31 (DO\ 645) - 0.14 (DO\ 630)$$

$$\text{Clorofila b (mg Al}^{-1}\text{)} = 20.7 (DO\ 645) - 4.34 (DO\ 665) - 4.42 (DO\ 630)$$

$$\text{Clorofila c (mg Al}^{-1}\text{)} = 55 (DO\ 630) - 4.64 (DO\ 665) - 16.3 (DO\ 645)$$

1. 9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un diseño factorial completamente aleatorio. Los resultados obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente, se realizó comparación de medias con prueba Tukey para identificar diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se analizó el efecto del estrés por baja temperatura en plantas de jitomate haciendo una comparación entre plantas inoculadas y no inoculadas con *T. asperellum*, así mismo entre plantas con y sin previa aclimatación al frío. Se precisó evaluar el desarrollo de las plantas en aspectos visibles y cuantitativos, donde se incluyó: la caracterización fenotípica, el índice de crecimiento, el diámetro del tallo, el desarrollo foliar (área foliar y número de hojas), la longitud de raíz, la biomasa, el contenido de clorofila y la fuga de electrolitos.

1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS PLANTAS DE JITOMATE

Con el propósito de evaluar a nivel fenotipo el efecto de *T. asperellum* sobre las plantas de jitomate expuestas a frío, se realizó un seguimiento del desarrollo y crecimiento de las plantas. En la Figura 2 se muestran plantas representativas de cada grupo de tratamiento, donde se observa que las plantas de *S. lycopersicum* pertenecientes al grupo 1 bajo condiciones de invernadero e inoculadas con *T. asperellum* presentaron un crecimiento más robusto respecto a las plantas sin inocular.

Continuando con el grupo 2 (Figura 2), se apreció un crecimiento limitado. Las plantas eran pequeñas y desarrollaron síntomas de estrés tras la exposición a frío con previa aclimatación, principalmente deshidratación de sus hojas que se extendió desde la punta hasta la base de la hoja, provocando su marchitez. Este efecto fue más marcado en las plantas sin *T. asperellum*. Por su parte, las plantas con *T. asperellum* también revelaron síntomas de daño por frío, aunque no tan severos, además presentaron mayor desarrollo visible de su sistema radicular.

En el grupo 3, las plantas con *T. asperellum* conservaron su capacidad de crecimiento y desarrollo ante el estrés por frío directo, siendo visiblemente mayores a las plantas sin *T. asperellum* expuestas a la misma condición que revelaron menor vigor y un sistema radicular reducido (Figura 2).

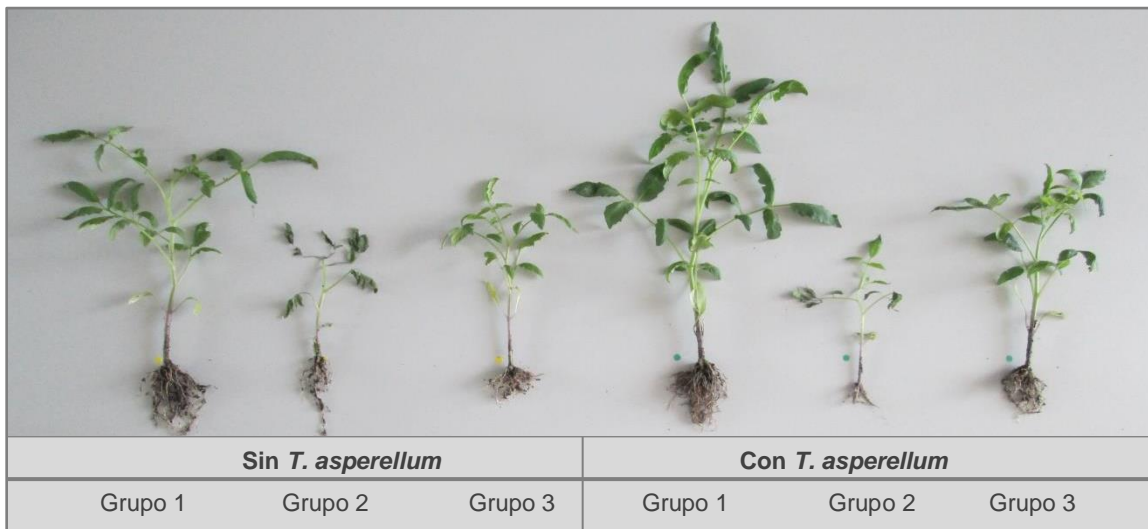


Figura 2. Evaluación a nivel fenotipo de plantas de *S. lycopersicum* expuestas a los diferentes tratamientos térmicos. De izquierda a derecha se muestran tres plantas representativas sin *T. asperellum*, seguidas de tres plantas previamente inoculadas con *T. asperellum*, siguiendo el orden mencionado para ambos casos: la primera planta representa a las plantas crecidas bajo condiciones de invernadero (Grupo 1), en segundo lugar las plantas que se sometieron a proceso de aclimatación con 10 °C que posteriormente se sometieron a frío con 4 °C (Grupo 2) y en tercer lugar las plantas expuestas a frío directo con 4 °C (Grupo 3). Plantas representativas de 6 experimentos.

2. ÍNDICE DE CRECIMIENTO

El índice de crecimiento es un parámetro agronómico que se calcula a partir de mediciones de referencia de las plantas a evaluar y sirve para identificar cuánto crecieron dichas plantas durante el periodo establecido.

Los resultados de la evaluación del índice de crecimiento mostraron que las plantas del grupo 1 \pm *T. asperellum* crecieron con el mayor índice respecto al resto de los grupos (Figura 3). Las plantas inoculadas mostraron un índice de crecimiento significativamente mayor respecto a las plantas del mismo grupo sin inocular.

Las mediciones de las plantas del grupo 2 se realizaron en dos tiempos, como se aprecia en la Figura 3: a) al término de la aclimatación; y b) al término del estrés por frío a 4 °C. En la primera comparación, al término de la aclimatación se encontró que de los individuos de este grupo, las plantas con *T. asperellum* presentaron un índice significativamente mayor. Por otro lado, en la segunda comparación al término del estrés por frío no se presentó diferencia entre plantas con y sin *T. asperellum* revelando el menor crecimiento de los diferentes grupos, indicando que la aclimatación está afectando el crecimiento de las plantas (Figura 3).

El índice de crecimiento de las plantas del grupo 3 fue intermedio respecto a los demás grupos y, dentro de éste, el mayor índice de crecimiento se identificó en plantas con *T. asperellum* aunque mostrando similitud estadística con plantas sin inoculación (Figura 3).

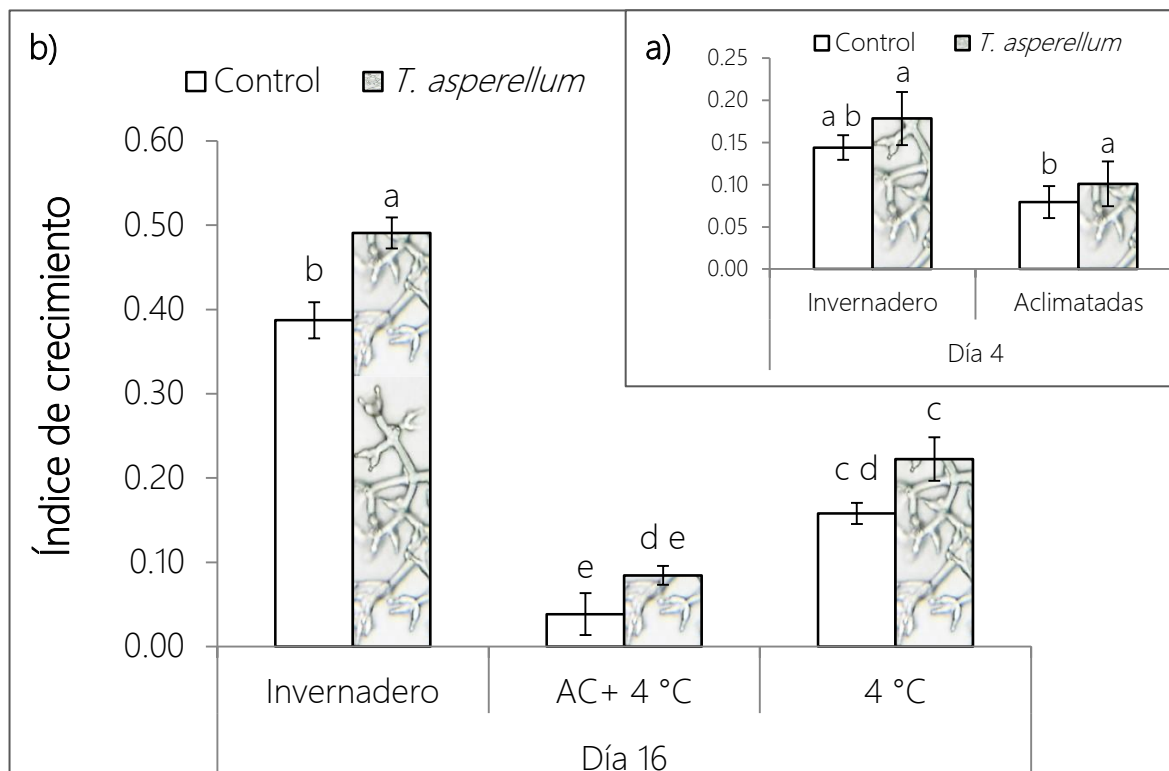


Figura 3. Índice de crecimiento de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum*. a) Comparación de plantas bajo condiciones de invernadero, seguidas por plantas al término de la aclimatación. b) De izquierda a derecha plantas libres de estrés térmico conservadas en invernadero, seguidas de plantas con previa aclimatación y posteriormente expuestas a estrés con frío (AC+ 4 °C) y en último lugar plantas con exposición a frío directo (4 °C). Cada columna representa el promedio con error estándar de la media (\pm SEM) (n=12), de dos experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

3. DIÁMETRO DE TALLO

En el presente trabajo se consideró la evaluación del diámetro de tallo, asumiendo la importancia que representan los tejidos vasculares para el adecuado transporte de agua y minerales.

Los resultados mostraron que las plantas de *S. lycopersicum* conservadas en el grupo 1 presentaron el mayor diámetro de tallo respecto a los demás grupos, sin revelar diferencia significativa entre plantas \pm *T. asperellum* (Figura 4).

En las plantas del grupo 2 se registró el menor diámetro de tallo entre los grupos evaluados, tras el proceso de aclimatación y al término de estrés por frío, presentando en ambos tiempos de medición igualdad estadística entre plantas \pm *T. asperellum* (Figura 4).

Por otro lado, en plantas del grupo 3 \pm *T. asperellum* se identificó un diámetro de tallo intermedio respecto a los demás grupos durante el reto con frío. El diámetro de su tallo fue ligeramente superior en plantas con *T. asperellum* sin mostrar diferencia significativa (Figura 4).

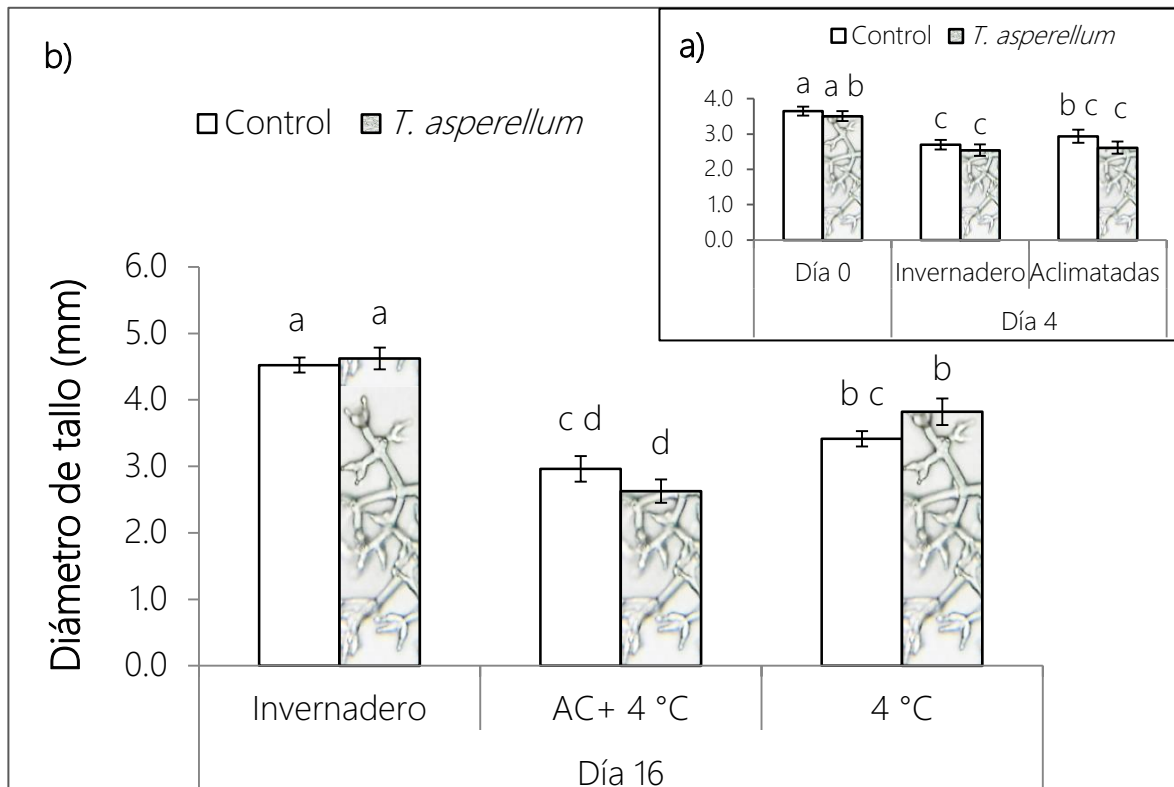


Figura 4. Diámetro de tallo de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum* expresado en milímetros. a) Comparación de plantas bajo condiciones de invernadero, seguidas por plantas al término de la aclimatación. b) De izquierda a derecha plantas libres de estrés térmico conservadas en invernadero, seguidas de plantas con previa aclimatación y posteriormente expuestas a estrés con frío (AC+ 4 °C) y en último lugar plantas con exposición a frío directo (4 °C). Cada columna representa el promedio \pm SEM (n=12), de dos experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

4. DESARROLLO FOLIAR DE LAS PLANTAS DE JITOMATE

Para la evaluación del desarrollo foliar, se consideró el número de hojas y el área de las mismas. Se contabilizaron las hojas de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum* para evaluar la capacidad de formación de tejido vegetal (Figura 5), y además se determinó su área foliar (Figura 6), brindando información sobre la superficie disponible para la captación de energía lumínica.

Las plantas del grupo 1 \pm *T. asperellum* mostraron el mayor número de hojas, así como la mayor área foliar respecto los demás grupos con un notable incremento en plantas con *T. asperellum*, aunque sin revelar diferencia significativa entre plantas (Figura 5).

Mientras que la menor formación de hojas y área foliar se encontró en las plantas del grupo 2, si bien al término del proceso de aclimatación no se reveló diferencia significativa entre plantas \pm *T. asperellum*, los resultados al término del estrés por frío, indicaron que las plantas previamente aclimatadas registraron el menor número de hojas sin diferencia entre plantas \pm *T. asperellum* (Figura 5).

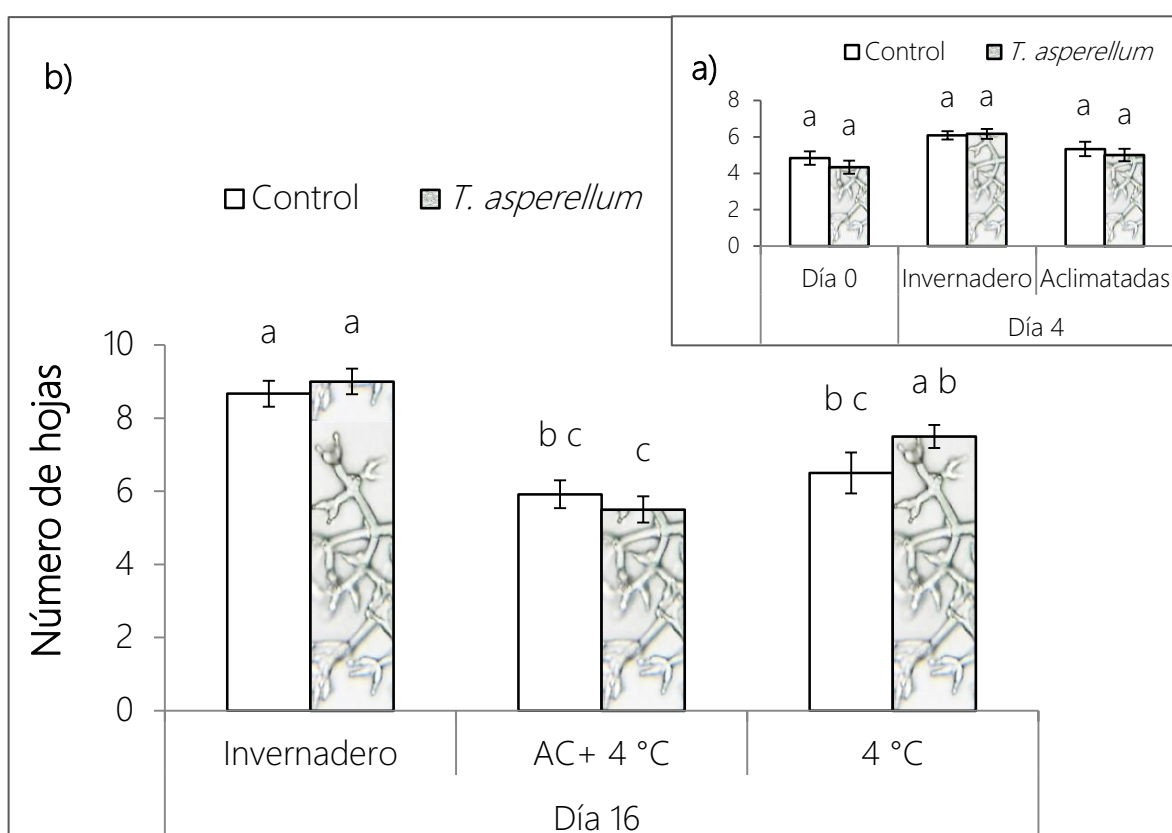


Figura 5. Número de hojas de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum*. a) Comparación de plantas bajo condiciones de invernadero, seguidas por plantas al término de la aclimatación. b) De izquierda a derecha plantas libres de estrés térmico conservadas en invernadero, seguidas de plantas con previa aclimatación y posteriormente expuestas a estrés con frío (AC+ 4 °C) y en último lugar plantas con exposición a frío directo (4 °C). Cada columna representa el promedio \pm SEM (n=12), de dos experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

En cuanto al área foliar de las plantas previamente aclimatadas del grupo 2 se identifica una mayor expansión del área foliar en plantas con *T. asperellum* aunque sin diferencia significativa (Figura 6).

En las plantas del grupo 3 se encontraron valores intermedios en su número de hojas respecto a los demás grupos, sin diferencia significativa entre plantas \pm *T. asperellum*. En este grupo los valores promedio del área foliar fueron mayores en plantas con *T. asperellum* revelando igualdad estadística con las plantas con *T. asperellum* del grupo 1; sin embargo, en la prueba Tukey no se encontró diferencia significativa entre plantas \pm *T. asperellum* del mismo grupo.

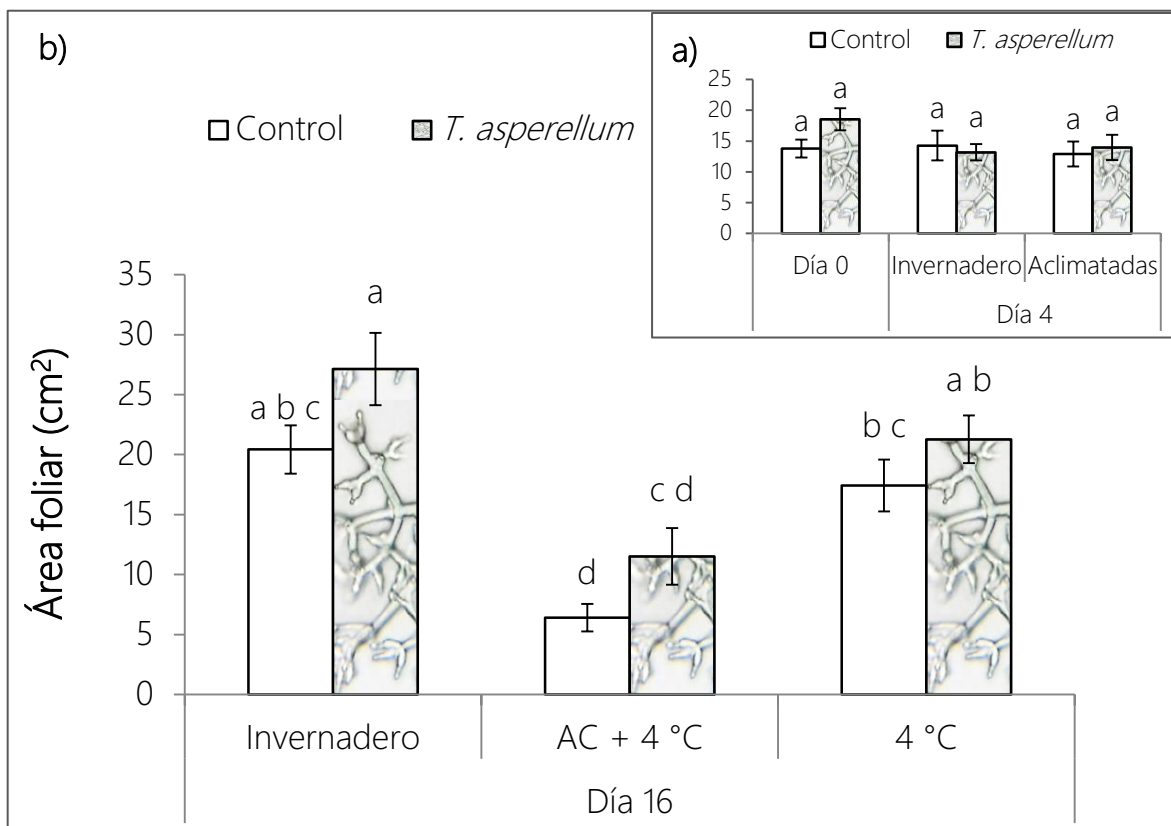


Figura 6. Área foliar de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum* expresado en cm². a) Comparación de plantas bajo condiciones de invernadero, seguidas por plantas al término de la aclimatación. b) De izquierda a derecha plantas libres de estrés térmico conservadas en invernadero, seguidas de plantas con previa aclimatación y posteriormente expuestas a estrés con frío (AC+ 4 °C) y en último lugar plantas con exposición a frío directo (4 °C). Cada barra representa el promedio \pm SEM (n=12), de dos experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

5. LONGITUD DE RAÍZ

El crecimiento longitudinal del sistema radicular de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum* se determinó al concluir los tratamientos térmicos con el fin de identificar diferencias estadísticas, puesto que de manera visible, la capacidad de formación de raíces (Figura 2) se apreció más robusta y vigorosa en plantas con *T. asperellum*.

Considerando la longitud de las raíces a partir del cuello de la planta, se alineó el sistema radicular y se midió hasta la punta de al menos tres raíces juntas. Los resultados no revelaron diferencia significativa entre plantas de jitomate \pm *T. asperellum* ni entre ninguno de los grupos evaluados con la prueba de comparación Tukey (Figura 7).

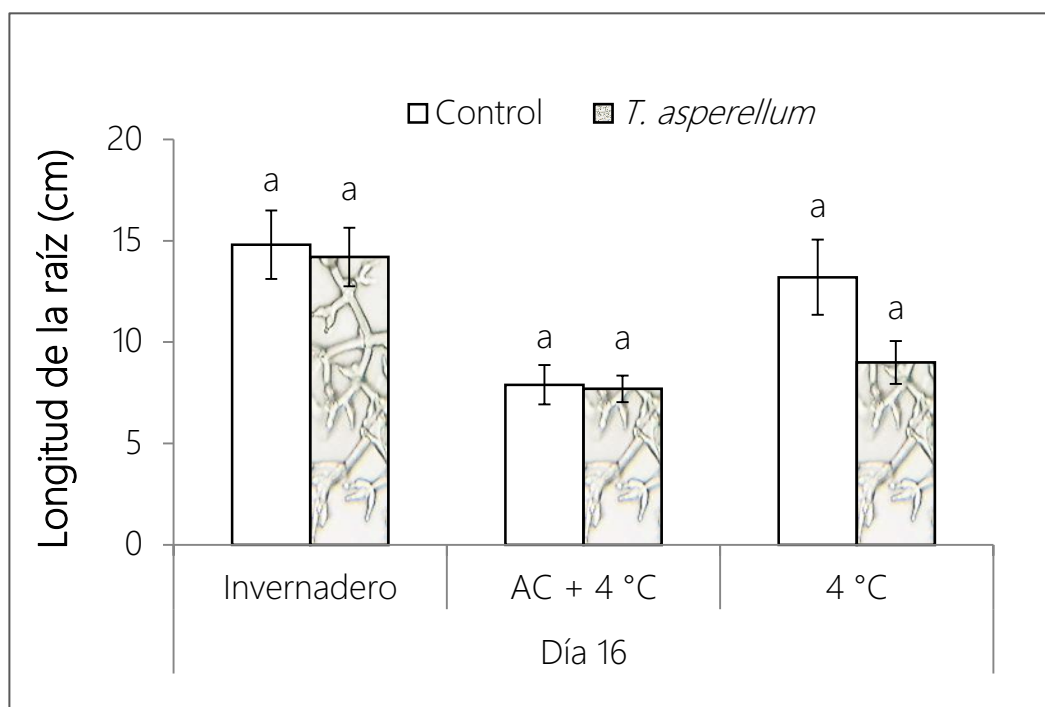


Figura 7. Longitud de raíz de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum* expresado en centímetros. Comparación de plantas bajo condiciones de invernadero, seguidas de plantas con previa aclimatación y posteriormente expuestas a estrés con frío (AC+ 4 °C) y en último lugar plantas con exposición a frío directo (4 °C). Cada columna representa el promedio \pm SEM (n=12), de dos experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

6. BIOMASA

Una vez concluidos los tratamientos térmicos, se determinó la cantidad de material vegetal presente en las plantas evaluadas derivada de la eficiencia del proceso de fotosíntesis y expresada en unidades de materia seca acumulada de la parte aérea y radicular.

La mayor ganancia de biomasa entre grupos correspondió a las plantas de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum* conservadas en el grupo 1. Por el contrario, en el grupo 2 se registró la menor producción de biomasa respecto a los demás grupos, donde la ganancia de biomasa resultó afectada de forma notable tras exponerse a estrés por frío con previa aclimatación, sin diferencia significativa entre plantas \pm *T. asperellum*.

En cuanto a las plantas del grupo 3, se identificó una ganancia de biomasa intermedia entre el resto de los grupos, a pesar de no presentar diferencia significativa entre plantas \pm *T. asperellum* en este grupo el peso promedio de las plantas inoculadas fue ligeramente mayor (Figura 8).

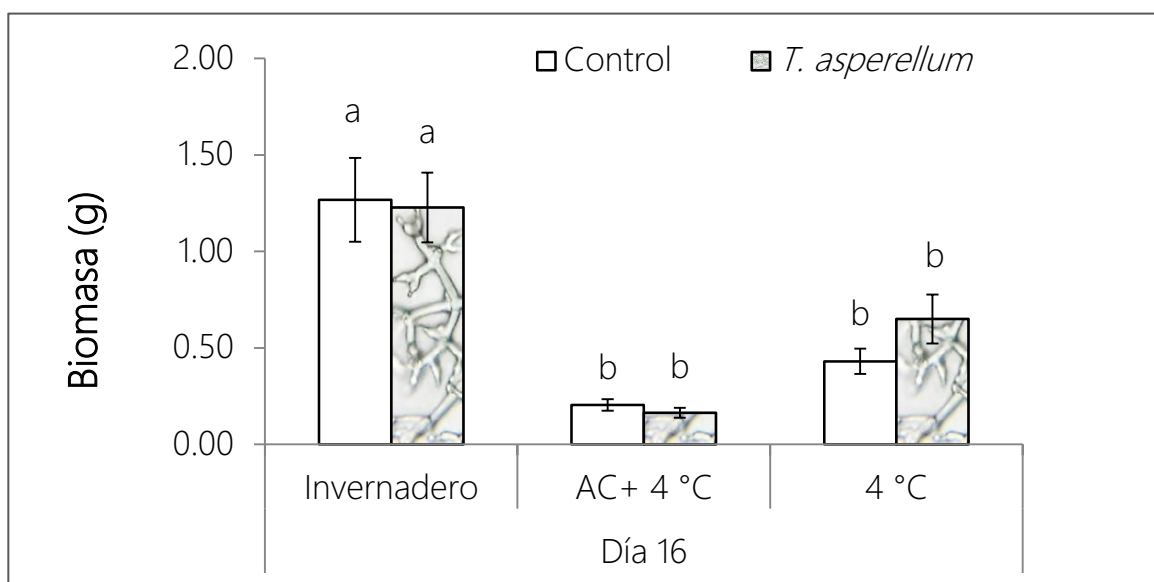


Figura 8. Biomasa de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum* expresado en gramos. Comparación de plantas bajo condiciones de invernadero, seguidas por plantas con previa aclimatación y posteriormente expuestas a estrés con frío (AC+ 4 °C) y en último lugar plantas con exposición a frío directo (4 °C). Cada columna representa el promedio \pm SEM (n=12), de dos experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$

7. CONTENIDO DE CLOROFILA

El contenido de clorofila como pigmento fotosintético se evaluó con un método no destructivo (sensor SPAD) y otro destructivo (espectrometría).

Los resultados de las lecturas periódicas del contenido de clorofila en unidades SPAD no revelaron diferencia significativa entre plantas de jitomate \pm *T. asperellum* ni entre ninguno de los grupos evaluados con la prueba de comparación Tukey (Figura 9).

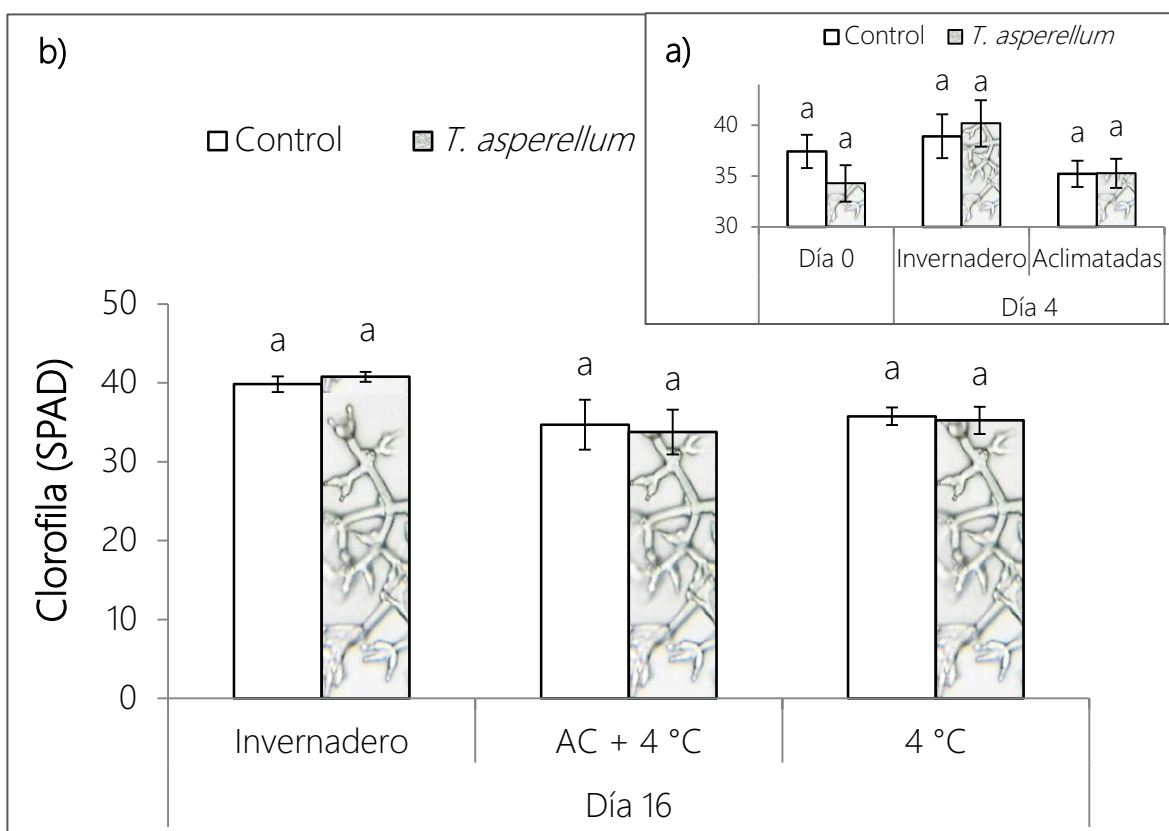


Figura 9. Contenido de clorofila de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum* expresado en unidades SPAD. a) Comparación de plantas bajo condiciones de invernadero, seguidas por plantas al término de la aclimatación. b) De izquierda a derecha plantas libres de estrés térmico conservadas en invernadero, seguidas de plantas con previa aclimatación y posteriormente expuestas a estrés con frío (AC+ 4 °C) y en último lugar plantas con exposición a frío directo (4 °C). Cada columna representa el promedio \pm SEM (n=12), de dos experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

Los resultados de la extracción de clorofilas revelaron que los niveles de clorofila *a*, en las plantas aclimatadas decreció un 18 % respecto a plantas que crecían libres de estrés, sin distinción entre plantas \pm *T. asperellum* mientras que las clorofilas *b* y *c* disminuyeron el 27 y 16 %, respectivamente, en plantas sin *T. asperellum*, y tan solo el 14 y 2 % en plantas con *T. asperellum*. (Figura 10).

En contraste, se detectó que en las plantas sin *T. asperellum* bajo el estrés por frío los niveles de clorofila *a*, *b* y *c* aumentaron un 38, 14 y 21%, respectivamente, mientras sus pares inoculadas mostraban una disminución correspondiente al 59, 56 y 36% respecto a las plantas libres de estrés (Figura 10).

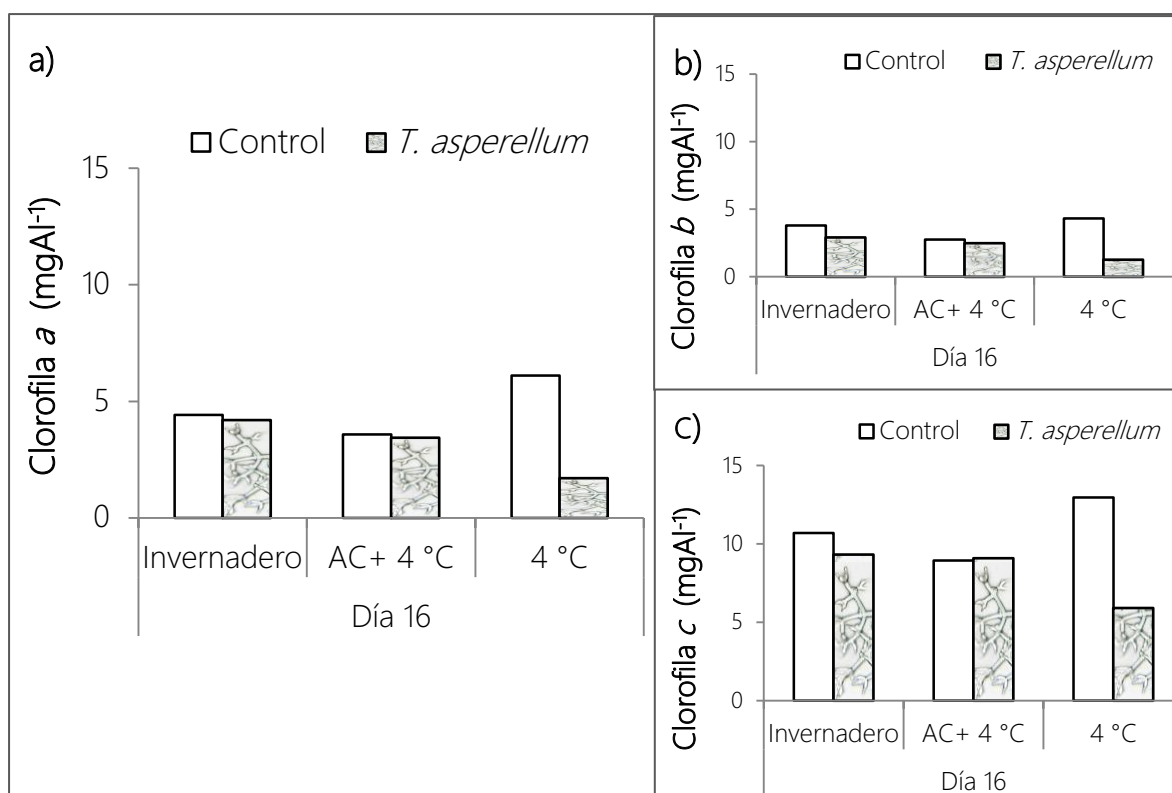


Figura 10. Contenido de clorofilas de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum* expresado en mgAl⁻¹. Comparación de plantas bajo condiciones de invernadero, seguidas por plantas con previa aclimatación y posteriormente expuestas a estrés con frío (AC+ 4 °C) y en último lugar plantas con exposición a frío directo (4 °C). Cada columna representa una lectura en espectrómetro por cada condición térmica al término del experimento. Gráficas por tipo de clorofila: a) Clorofila *a*, b) Clorofila *b*, c) Clorofila *c*.

8. FUGA DE ELECTROLITOS

Con el objetivo de evaluar la integridad celular de plantas de jitomate \pm *T. asperellum* expuestas a los tratamientos térmicos, se realizó un seguimiento del porcentaje de fuga de electrolitos en plantas representativas por cada condición. Los resultados mostraron que en las hojas de las plantas de jitomate \pm *T. asperellum* conservadas en el grupo 1 registraron la menor pérdida de electrolitos al crecer libres de estrés (Figura 11).

En las hojas de las plantas representativas del grupo 2 se registró una tendencia ascendente de fuga de electrolitos tras el proceso de aclimatación que siguió en aumento hasta el término de estrés por frío. En este grupo, las hojas de las plantas sin *T. asperellum* registraron la mayor pérdida electrolítica entre los grupos evaluados (Figura 11).

En las hojas de las plantas del grupo 3 se identificó que durante los primeros días del reto con frío la fuga de electrolitos fue semejante entre plantas \pm *T. asperellum*; sin embargo, con el paso del tiempo de exposición, la pérdida electrolítica fue decreciendo a valores mínimos en las plantas inoculadas, contrario a lo que se observó en ausencia de *T. asperellum*, donde la fuga de electrolitos fue en aumento tras la mayor exposición al estrés por frío (Figura 11).

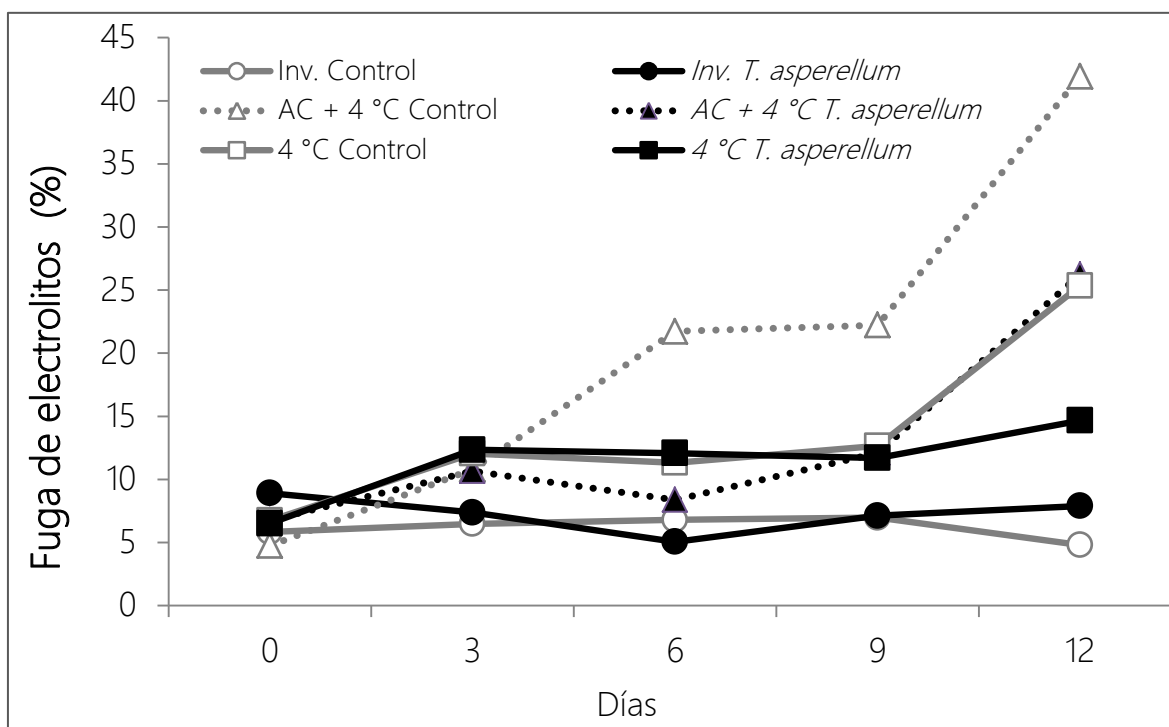


Figura 11. Fuga de electrolitos en hojas de *S. lycopersicum* \pm *T. asperellum* expresado en porcentaje. Cada línea representa el seguimiento de tres plantas por condición térmica. Líneas grises corresponden a plantas sin *T. asperellum*, líneas negras pertenecen a plantas con *T. asperellum* donde: plantas bajo condiciones de invernadero (Inv.) son representadas con marcador circular, mientras que las plantas con exposición a frío directo (4 °C) corresponde el marcador cuadrado. Las plantas con previa aclimatación y posteriormente expuestas a estrés con frío (AC+ 4 °C) se identifican con línea punteada y marcador triangular.

El incremento de pérdidas agrícolas causadas por bajas temperaturas invita a buscar y proponer soluciones integrales ante este tipo de estrés, razón por la cual en este estudio se evaluó el efecto de la cepa de *T. asperellum* como agente simbiote en plantas de jitomate sometidas a estrés por frío.

Bajo la premisa de que la inoculación con *T. asperellum* tiene efectos positivos en el desarrollo y sobrevivencia de plantas de jitomate sometidas a estrés de tipo abiótico, tales como salinidad (Zhang *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2017) y sequía (Mastouri *et al.*, 2010), se realizó una evaluación del posible efecto protector inducido por *T. asperellum* en plantas de jitomate expuestas a frío. El estudio incluyó la evaluación del proceso de aclimatación, previo al tratamiento por frío, pues de acuerdo con Barrero-Gil *et al.* (2016), el pretratamiento incrementa la sobrevivencia y promueve la biosíntesis de moléculas que funcionan como crioprotectores, principalmente aminoácidos y poliaminas (prolina, putrescina y ácido gamma-aminobutírico). De acuerdo con los resultados del presente trabajo, el proceso de aclimatación en plantas de jitomate, independientemente de la interacción con *T. asperellum*, resultó desfavorable para la tolerancia al frío. Las plantas aclimatadas presentaron menor desarrollo (Figuras 2 y 3), lo que podría indicar un efecto acumulativo de su prolongada exposición a temperaturas subóptimas de crecimiento.

En cuanto a los resultados de las plantas de jitomate expuestas a frío directo, se observó una marcada inhibición en los parámetros de crecimiento evaluados en las plantas sin *T. asperellum*, encontrando semejanza con el fenotipo previamente reportado (Aydin *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2015; Barrero-Gil *et al.*, 2016; Elkelish *et al.*, 2020), donde las plantas de jitomate designadas como controles y expuestas a los diversos niveles de estrés por frío prevaleció el crecimiento reducido, la clorosis y la marchitez del tejido expuesto. En contraste, los resultados de la inoculación con *T. asperellum* sobre los parámetros agronómicos apuntan a que la interacción resultó favorable para las plantas de jitomate, principalmente por la atenuación de la inhibición del crecimiento provocada por el estrés por frío directo. Hajjhashemi *et al.*, 2018 informan que durante bajas temperaturas incrementa el

diámetro de tallo para una mayor exportación de fotoasimilados. En este trabajo el diámetro de tallo en plantas inoculadas se mantuvo constante y ligeramente superior respecto a las plantas sin inocular, lo que podría indicar que la interacción con *T. asperellum* contribuye en mantener la funcionalidad de los tejidos conductores ante el estrés por frío favoreciendo la sobrevivencia de las plantas inoculadas. Esto es relevante considerando que la velocidad de absorción de agua, transporte y distribución de elementos nutritivos y fotoasimilados se ve reducida por la baja temperatura (Yuanyuan *et al.*, 2009).

En lo referente al desarrollo foliar, las plantas con *T. asperellum* sometidas a frío directo fueron estadísticamente semejantes a las plantas \pm *T. asperellum* libres de estrés, tanto en número de hojas como en la expansión de su lámina foliar, lo que podría relacionarse con la capacidad de *Trichoderma* spp. de favorecer la síntesis de fitohormonas que tienen un efecto promotor del crecimiento vegetal, por ejemplo: auxinas relacionadas con el crecimiento apical, diferenciación celular e incremento del área foliar y radicular; citocininas, que favorecen el desarrollo de brotes; y giberelinas, vinculadas con la elongación celular (Benítez *et al.*, 2004; Martínez-Medina *et al.*, 2014; Zehra *et al.*, 2017; Guzmán-Guzmán *et al.*, 2019).

En cuanto a la longitud de la raíz, no se encontró diferencia significativa entre plantas \pm *T. asperellum*, lo que podría relacionarse con lo que algunos autores han llamado efecto de la restricción radicular (Oberpaur *et al.*, 2011; Boschi, 2018), que se asocia a un tamaño reducido de contenedor, puesto que las plantas se desarrollaron en pequeñas macetas de 4 pulgadas, debido al limitado espacio disponible en el equipo de refrigeración. A pesar de las limitaciones físicas de crecimiento, la habilidad de *Trichoderma* spp. suele mejorar la disponibilidad de nutrientes en la solución del suelo, influyendo de forma positiva en el crecimiento y desarrollo de las plantas inoculadas, principalmente mediante la acción de sideróforos y secreción de ácidos orgánicos (Benítez *et al.*, 2004; Harman, 2006; Hermosa *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2019).

Respecto a los parámetros fisiológicos evaluados, el contenido de clorofila expresado en unidades SPAD no reveló diferencia significativa entre los grupos evaluados de plantas de jitomate \pm *T. asperellum*, razón por la cual se optó por

realizar, al término de los tratamientos térmicos, la cuantificación de clorofilas por espectrometría.

Es importante mencionar que la cuantificación se realizó una sola vez, de manera que los resultados no son concluyentes, a diferencia del resto de las variables medidas en el proyecto de investigación. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 10, los niveles de clorofila *a*, *b* y *c* en las plantas aclimatadas decreció sin mayor diferencia entre plantas \pm *T. asperellum*. En contraste, las plantas sin *T. asperellum* sometidas a estrés por frío registraron niveles elevados de clorofila *a*, *b* y *c*, mientras en inoculadas se encontró una disminución, lo cual permite sugerir que la prolongada exposición a temperaturas subóptimas de crecimiento provocan la degradación de las clorofilas y, por consiguiente, su baja detección mediante la prueba. De hecho, está reportado que plantas sensibles al frío tienden a disminuir su cantidad de clorofilas debido a la afectación en su biosíntesis bajo este tipo de estrés (Hajihashemi *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018).

Por otro lado, existe la posibilidad de que durante la lectura de las muestras se hayan detectado clorofilas no funcionales u otro tipo de pigmentos, pues como indican Millan-Núñez y Álvarez-Borrego (1978), es posible la sobreestimación de clorofilas primeramente cuando se presenta una degradación de pigmentos y, en segundo lugar, por fluctuaciones en el método empleado así como el coeficiente de absorbancia utilizado, considerando el método Parsons y Stickland (1963).

La evaluación de la integridad celular mediante la fuga de electrolitos también fue incluido en el estudio. La mayoría de los procesos fisiológicos de las plantas se relacionan con las membranas celulares. El frío suele provocar en las plantas una mayor difusión de los solutos provocado por el daño en la permeabilidad de la membrana plasmática (Suzuki y Mittler, 2006; Solanke y Sharma, 2008; Miura y Tada, 2014). Los componentes lipídicos son susceptibles a la peroxidación por interacción con las ROS. El radical hidroxilo y el oxígeno singlete, por ejemplo, sustraen átomos de H⁺ de los grupos metilo de ácidos grasos, provocando una continua formación de radicales libres, que al ser moléculas inestables reaccionan con otros ácidos grasos y demás componentes celulares provocando daño o

pérdida irreversible de la funcionalidad de la membrana plasmática (Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007; Theocharis *et al.*, 2012; Demidchik, 2014).

En este trabajo se registró una elevada fuga de electrolitos en las plantas de jitomate tras la mayor exposición al estrés por frío; sin embargo, las plantas con *T. asperellum* presentaron una menor fuga de electrolitos demostrando que la interacción simbiótica brinda una protección efectiva al conservar las funciones membranales de las células. La menor fuga de electrolitos en plantas con *T. asperellum* podría estar involucrada con la menor peroxidación lipídica, derivada de una mayor actividad del sistema antioxidante en las plantas inoculadas, tal como previamente se demostró al detectar un incremento considerable en la actividad de la superóxido dismutasa, de la peroxidasa y de la catalasa en plantas de trigo inoculadas con *Trichoderma longibrachiatum*, mejorando de ese modo la captura de las ROS generadas durante estrés salino, que semejante al estrés por frío ocasiona una severa deshidratación y pérdida de solutos (Zhang *et al.*, 2016).

Existe una menor pérdida de electrolitos en plantas de jitomate preinoculadas con *T. harzianum* expuestas a baja temperatura (8 °C, durante 6 días) (Ghorbanpour *et al.*, 2018). De manera interesante, la intensidad del estrés por frío que se empleó en este trabajo fue mayor (4 °C, durante 12 días) y aun así se identificó que *T. asperellum* mitigó el daño por frío y promovió una menor pérdida electrolítica (Figura 11).

CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES

Mediante la evaluación de variables agronómicas y fisiológicas se concluye que el hongo *T. asperellum* atenuó el daño por frío en plantas de *S. lycopersicum* sin que influyera positivamente una previa aclimatación.

Sería apropiado para investigaciones futuras una fase de recuperación tras el estrés por frío de plantas de jitomate para evaluar si el efecto protector derivado de la interacción con *T. asperellum* perdura cuando las plantas retornan a la temperatura óptima de crecimiento. De igual manera, sería fructífero profundizar la evaluación de los parámetros fisiológicos involucrados en la atenuación del daño por frío en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *T. asperellum*, ya que este efecto protector podría estar involucrado con la regulación de ROS, por lo que una evaluación de la actividad enzimática sería un excelente seguimiento. Asimismo, sería benéfico aumentar el tamaño de la muestra aunque en experimentos independientes esto debido a que, el espacio al interior del equipo de refrigeración es reducido. Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados que se reportan ofrecen una perspectiva del efecto de *T. asperellum* durante el estrés por frío en las variables agronómicas y parámetros fisiológicos brevemente abordados en este trabajo.

- Agrawal, A. A., Conner, J. K. y Stinchcombe, J. R. (2004). Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecology Letters*, 7: 1199–1208 doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00680.x
- Agrios, G. N. (2013). Fitopatología. (2a. Ed.) México: LIMUSA.
- Agurla, S., Gahir, S., Munemasa, S., Murata, Y. y Raghavendra, A. S. (2018). Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1081: 215-232 doi: 10.1007/978-981-13-1244-1_12
- Ahmed, S. M., Hershberger, P. J. y Lemkau, J. P. (2016). Cap. 3 Psychosocial influences on health. En Rakel, R. E; Rakel D. P. (Eds), *Textbook of Family Medicine*. (25- 33). Philadelphia. Elsevier.
- Akula, R. y Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling Behav.* 6:1720–1731. doi.org/10.4161/psb.6.11.17613
- Apel, K. y Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399. doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Atayee, A. R. y Noori, M. S. (2020). Alleviation of cold stress in vegetable crops. *J. Agric. Sci.* 4: 38-44 doi: 10.25081/jsa.2020.v4.6110
- Aydin, S.S. Büyük, İ. y Aras, S. (2013). Relationships among lipid peroxidation, SOD enzyme activity, and SOD gene expression profile in *Lycopersicon esculentum* L. exposed to cold stress. *Genet Mol Res.* 12: 3220-3229 doi.org/10.4238/2013
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. (2a. Ed.) España: McGRAW HILL.
- Barrero-Gil, J., Huertas, R., Rambla, J. L., Granell, A., y Salinas, J. (2016). Tomato plants increase their tolerance to low temperature in a chilling acclimation

- process entailing comprehensive transcriptional and metabolic adjustments. *Plant Cell Environ* 39: 2303-2318 doi.org/10.1111/pce.12799
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., y Codón, A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol.* 7: 249-260
- Bilyavska, N. O., Fediuk, O. M. y Zolotareva, E. K. (2019). Chloroplasts of cold-tolerant plants. *Plant Sci. Today.* 6: 407-411 doi.org/10.14719/pst.2019.6.4.584
- Blanco, Y. (2006). La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. *Cultivos tropicales.* 27: 5-17
- Bocourt, Y. M., Díaz, D. C. C., y López, G. A. (2013). Efectividad de aplicación de bioplaguicida a través del sistema de riego localizado por microaspersión en el cultivo del tomate. *Rev Cie Téc Agr.* 22: 41-46
- Boschi, C. L. (2019). Fitohormonas involucradas en la restricción radical de plantas creciendo en contenedores de bajo volumen. *Avances de investigación agropecuaria.* 23: 15-22 Recuperado de: <https://www.redalyc.org/journal/837/83760632002/html/>
- Camarena-Gutiérrez, G. y de la Torre-Almaráz, R. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.* 13: 157-162
- Chaves-Barrantes, N. F. y Gutiérrez-Soto, M. V. (2017). Respuestas al estrés por calor en los cultivos. I. Aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos. *Agron. Mesoam.* 28: 237-253 dx.doi.org/10.15517/am.v28i1.21903.
- Chávez, G. M. P. (2006). Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana.
- Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L., y Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J Exp Biol.* 217: 67–75 doi.org/10.1242/jeb.089938

- Conrath, U. (2006). Systemic Acquired Resistance. *Plant Signal Behav.* 1: 179-184
doi: 10.4161/psb.1.4.3221
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E. y Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol Ecol.* 92: 1-17 doi: 10.1093/femsec/fiw036
- Demidchik, V. (2014) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.* 109: 212-228. doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021
- Elkelish, A., Qari, S. H., Mazrou, Y. S. A., Abdelaal, K. A. A., Hafez, Y. M., Abu-Elsaoud, A. M., Batiha, G., E-S., El-Esawi, M. A., Nahhas, N. E. (2020). Exogenous ascorbic acid induced chilling tolerance in tomato plants through modulating metabolism, osmolytes, antioxidants, and transcriptional regulation of catalase and heat shock proteins. *Plants.* 9: 1-21 doi:10.3390/plants9040431
- Ensminger, I., Busch, F. y Huner, N. P. A. (2006). Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiol. Plant.* 126: 28-44 doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00627.x
- Escobar, H. y Lee, R. (2009). Manual de producción de tomate bajo invernadero. (2a. Ed.) Colombia: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Fu, J., Liu, Z., Li, Z., Wang, Y., 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: 1-20. doi.org/10.1371/journal.pone.0179617
- Garg, N. y Manchanda, G. (2009): ROS generation in plants: Boon or bane?. *Plant Biosyst* 143: 81-96 doi.org/10.1080/11263500802633626
- Ghorbanpour, A., Salimi, A., M. A. T., Pirdashti, H. y Dehestani, A. (2018). The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in

- tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Sci Hort.* 230: 134-141. doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.028
- Guo, X., Liu, D. y Chong, K. (2018) Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation. *J. Integr. Plant Biol.* 6: 745–756 doi: 10.1111/jipb.12706
- Guzmán-Guzmán, P., Porrás-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., y Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology*, 109: 6–16 doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW
- Hajjhashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J., Djalovic, I., y Siddique, K. (2018). Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. *Front Plant Sci.* 9: 1-12 doi: 10.3389/fpls.2018.01430.
- Harman, G. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96: 190-194. doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190
- Harris, W., Lynch, P. T., Hargreave, A. J., y Bonner, P. L. (2004). Cryopreservation of *Helianthus tuberosus* cell suspension cultures: the effect of preculture treatments on cytoskeletal proteins and transglutaminase activity. *Cryo letters.* 25: 213–217.
- He, M., Qin, C. X., Wang, X., y Ding, N. Z. (2020). Plant unsaturated fatty acids: biosynthesis and regulation. *Front Plant Sci.* 11: 1-13 doi.org/10.3389/fpls.2020.00390
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology.* 158: 17-25 doi: 10.1099/mic.0.052274-0
- Herrera, T. V. I. (2018). Producción de inóculo de *Trichoderma* y su efecto en el crecimiento vegetativo de plantas de Jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo.
- Herrera-Téllez, V. I., Cruz-Olmedo, A. K., Plasencia, J., Gavilanes-Ruíz, M., Arce-Cervantes, O., Hernández-León, S., y Saucedo-García, M. (2019). The

protective effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 1-13 doi.org/10.3390/ijms20082007

Hetherington, S. E., He, J. y Smillie, R. M. (1989). Photoinhibition at low temperature in chilling sensitive and resistant plants. *Plant physiol.* 90: 1609-1615 doi: 10.1104 / pp.90.4.1609

Hidangmayum, A. y Dwivedi, P. (2018). Plant responses to *Trichoderma* spp. and their tolerance to abiotic stresses: a review. *J Pharmacogn Phytochem.* 7: 758-766

Hou., Q., Ufer, G. y Bartels, D. (2016). Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell Environ* 39: 1029–1048 doi: 10.1111/pce.12666

Hu, Y., Jiang, Y., Han, X., Wang, H., Pan, J., y Yu, D. (2017). Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: crosstalk with other phytohormones. *J. Exp. Bot.* 68: 1361–1369. doi.org/10.1093/jxb/erx004

Huang, W., Yang, Y. J., Hu, H., y Zhang, S. B. (2016). Moderate photoinhibition of Photosystem II protects Photosystem I from photodamage at chilling stress in tobacco leaves. *Front. Plant Sci.* 7: 1-9 doi.org/10.3389/fpls.2016.00182

Hurry, V. M., y Huner, N. P. (1991). Low growth temperature effects a differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. *Plant Physiol.* 96: 491–497. doi.org/10.1104/pp.96.2.491

Idárraga, G. J. (2009). Relaciones ecológicas entre las plantas en el ambiente urbano de Medellín. Tesis de grado. Escuela de Ingeniería de Antioquía.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2019). Encuesta Nacional Agropecuaria. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/programas/ena/2019/>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. [INEGI]. (2017). Encuesta Nacional Agropecuaria. Recuperado de: <https://www.inegi.org.mx/programas/ena/2017/>

- Jogaiah, S., Abdelrahman, M., Tran, L. P., e Ito, S. I. (2018). Different mechanisms of *Trichoderma virens* mediated resistance in tomato against *Fusarium* wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Mol. Plant Pathol.* 19: 870–882. doi.org/10.1111/mpp.12571
- Kazemi-Shahandashti, S. S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., y Ramezanpour, S. S. (2013). Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. *Mol Biol Rep.* 40: 893–903. doi.org/10.1007/s11033-012-2130-x
- Khan, M. I., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., y Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 6: 1-17. doi: 10.3389/fpls.2015.00462
- Ku, Y. S., Sintaha, M., Cheung, M. Y. y Lam, H. M. (2018). Plant Hormone Signaling Crosstalks between Biotic and Abiotic Stress Responses *Int. J. Mol. Sci.* 19: 1-35 doi.org/10.3390/ijms19103206
- Larrieu, A., y Vernoux, T. (2016). Q&A: How does Jasmonate signaling enable plants to adapt and survive?. *BMC Biol.* 14: 1-8 doi.org/10.1186/s12915-016-0308-8
- Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S. K. y White Jr., J.F. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Lett. Appl. Microbiol.* 66: 268-276 doi:10.1111/lam.12855
- Lee, S. C., y Luan, S. (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ.* 35: 53–60 doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02426.x
- Linares, M. J., Vásquez, C. E., Ramos, R. M. I. (2020). Las interacciones ecológicas y su importancia para el hombre. Instituto de Ecología. Recuperado de: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/2017-06-26-16-35-48/17-ciencia-hoy/689>

- Liu, X., Zhou, Y., Xiao, J., y Bao, F. (2018). Effects of chilling on the structure, function and development of chloroplasts. *Front. Plant Sci.* 9: 1-10 doi.org/10.3389/fpls.2018.01715
- Madriz-Ordeñana, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo integrado de plagas.* 63: 22-32. Disponible en: hdl.handle.net/11554/6562
- Mainardi, F. F., Boffelli, E. y Sirtori, G. (2013). Enciclopedia del jardín y del huerto. (2a. Ed.) España: DE VECCHI EDITORIAL.
- Martínez-Medina, A., Del Mar Alguacil, M., Pascual, J. A., y Van Wees, S. C. (2014). Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *J Chem Ecol.* 40: 804–815. doi.org/10.1007/s10886-014-0478-1
- Martínez-Medina, A., Fernández, I., Sánchez-Guzmán, M. J., Jung, S. C., Pascual, J. A. y Pozo, M. J. (2013). Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Front. Plant Sci.* 4: 1-12 doi.org/10.3389/fpls.2013.00206
- Mastouri, F., Björkman, T. y Harman, G. E. (2010). Seed Treatment with *Trichoderma harzianum* Alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology.* 100: 1213-1221 doi: 10.1094/PHYTO-03-10-0091
- Matías, R. L. G., Fuentes, M. O. A., García, J. F. y Jiménez, E. M. (2001). Heladas. (1a. Ed.) México: Centro Nacional de Prevención de Desastres [CENAPRED].
- Michalek, A. M. (2017). Climate change!. *J Canc Educ.* 32: 209-210 doi: 10.1007/s13187-017-1218-3
- Millán-Núñez, R y Álvarez-Borrego, S. (1978). Ecuaciones espectrofotométricas tricromáticas para la determinación de clorofilas a, b y c y sus feofitinas. *Ciencias marinas.* 5: 47-55 dx.doi.org/10.7773/cm.v5i1.315

- Mittler, R. (2016). ROS are good. *Trends Plant Sci* 20: 1-9 doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002
- Miura, K., y Tada, Y. (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.* 5: 1-12. doi: 10.3389/fpls.2014.00004
- Mota, T. M., Oshiquiri, L. H., Lopes, É., Barbosa Filho, J. R., Ulhoa, C. J., y Georg, R. C. (2019). Hsp genes are differentially expressed during *Trichoderma asperellum* self-recognition, mycoparasitism and thermal stress. *Microbiol. Res.* 227: 1-9 doi.org/10.1016/j.micres.2019.126296
- Murata, N., y Wada, H. (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308: 1–8. doi.org/10.1042/bj3080001
- Ntatsi, G., Savvas, D., Papatotiropoulos, V., Katsileros, A., Zrenner, R. M., Hinch, D. K., Zuther, E. y Schwarz, D. (2017). Rootstock sub-optimal temperature tolerance determines transcriptomic responses after long-term root cooling in rootstocks and scions of grafted tomato plants. *Front. Plant Sci.* 8: 1-15 doi:10.3389/fpls.2017.00911
- Oberpaur, C., Nieto, L. Délano, G. (2011). Influencia de tres volúmenes de contenedor en el almácigo y cultivo de coliflor. *IDESIA.* 29: 29-36 Recuperado de: <https://www.scielo.cl/pdf/idesia/v29n1/art05.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2020). Portal terminológico de la FAO. Recuperado de: fao.org/faoterm/es/?defaultCollId=4
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2020). Cambio climático. Recuperado de: <http://www.fao.org/climate-change/es/>
- Örvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F., y Dhindsa, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plants cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23: 785-794. doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00845.x

- Parsons, T. R. y Strickland, J. D. H. (1963). Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Marine Res.* 21: 155-163.
- Peleg, Z. y Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 290–295 doi: 10.1016/j.pbi.2011.02.001
- Ramírez, G. M. y Rodríguez, A. (2012). Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión. *Rev. colomb. biotecnol.* 14: 271-284 Disponible en: redalyc.org/articulo.oa?id=77624081025
- Rolny, N., Costa, L., Carión, C. y Guiament, J. J. (2011). Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence?. *J. Plant Physiol. Biochem.* 49: 1220-1227 doi: 10.1016/j.plaphy.2011.06.010.
- Ruelland, E. y Zachowski, A. (2010). How plants sense temperature. *Environ. Exp. Bot.* 69: 225–232 doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.011
- Ruelland, E., Vaultier, M. N., Zachowski, A. y Hurry, V. (2009). Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research.* 49: 35-150 doi: 10.1016/S0065-2296(08)00602-2
- Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2018). Recuperado de: <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>
- Singh, B. N., Dwivedi, P., Sarma, B. K., Singh, G. S., y Singh, H. B. (2019). A novel function of N-signaling in plants with special reference to *Trichoderma* interaction influencing plant growth, nitrogen use efficiency, and cross talk with plant hormones. *Biotech.* 9: 1-13. doi.org/10.1007/s13205-019-1638-3
- Singh, J., Rajput, R. S., Bisen, K., Singh, S. y Singh, H. B. (2017). Cap. 24 Role of *Trichoderma* secondary metabolites in plant growth promotion and biological control. En Singh, H. B., Sarma, B. K. y Keswani, C. (Eds), *Advances in PGPR research.* (411-426). UK: CABI doi:10.1079/9781786390325.0411

- Solanke, A. U., y Sharma, A. K., (2008). Signal transduction during cold stress in plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 14: 69-79. doi: 10.1007/s12298-008-0006-2
- Subramanian, P., Kim, K., Krishnamoorthy, R., Mageswari, A., Selvakumar, y G., Sa, T. (2016) Cold stress tolerance in psychrotolerant soil bacteria and their conferred chilling resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under low temperatures. *PLoS One*. 11: 1-17 doi:10.1371/journal.pone.0161592
- Suzuki, N. y Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant*. 126: 45–51.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal. (3ra. Ed.) España: Universitat Jaume I.
- Theocharis, A., Clément, C., y Ait Barka, E. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. 235: 1091–1105 doi: 10.1007/s00425-012-1641-y
- Thorlby, G., Fourier, N. y Warren, G. (2004). The SENSITIVE TO FREEZING2 gene, required for freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, encodes a β -Glucosidase. *Plant cell*. 16: 2192-2203. doi:10.1105/tpc.104.024018
- Tjus, S. E., Møller, B. L., y Scheller, H. V. (1998). Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. *Plant physiol*. 116: 755–764 doi.org/10.1104/pp.116.2.755
- Tripathy, B.C, y Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal Behav*. 7: 1621–1633. doi: 10.4161/psb.22455.
- Tuteja, N., y Sopory, S. K. (2008). Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signal Behav*. 3: 525–536. doi.org/10.4161/psb.3.8.6186
- Ville, C. A. (1985). Biología. (7ma. Ed.) México: Nueva Editorial Interamericana.

- Viterbo, A. y Chet, I. (2006). TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol. Plant Pathol.* 7: 249–258 doi: 10.1111/J.1364-3703.2006.00335.X
- Vivanco, J.M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V. M. y Flores, H. E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia.* 52: 68-75. Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/especial/plagas-vegetales-817>
- Xue-Xuan, X., Hong-Bo, S., Yuan-Yuan, M., Gang, X., Jun-Na, S., Dong-Gang, G. y Cheng-Jiang, R. (2010). Biotechnological implications from abscisic acid (ABA) roles in cold stress and leaf senescence as an important signal for improving plant sustainable survival under abiotic-stressed conditions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30: 222-230 doi.org/10.3109/07388551.2010.487186
- Yuan, P., Yang, T. y Poovaiah, B. W. (2018) Calcium Signaling-Mediated Plant Response to Cold Stress. *Int J Mol Sci.* 19: 1-11 doi: 10.3390/ijms19123896
- Yuanyuan, M., Yali, Z., Jiang, L. y Hongbo, S. (2009). Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 2004-2010. doi.org/10.5897/AJB09.177
- Zehra, A., Meena, M., Kumar, M., Amir, M., y Upadhyay, R.S (2017). Synergistic effects of plant defense elicitors and *Trichoderma harzianum* on enhanced induction of antioxidant defense system in tomato against *Fusarium* wilt disease. *Bot Stud.* 58: 1-14 doi: 10.1186/s40529-017-0198-2.
- Zhang, S., Gan, Y. y Xu, B. (2016). Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Front. Plant Sci.* 7: 1-11 doi: 10.3389/fpls.2016.01405
- Ziaf, K., Loukehaich, R., Gong, P., Liu, H., Han, Q., Wang, T., Li, H., y Ye, Z. (2011). Abstract: A multiple stress-responsive gene ERD15 from *Solanum pennellii* confers stress tolerance in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 52: 1055–1067 doi.org/10.1093/pcp/pcr057