



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DOCTORAL

Evaluación de respuestas fisiológicas y bioquímicas inducidas por
Trichoderma asperellum en la tolerancia al frío en plantas de jitomate
Solanum lycopersicum

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M. en C.: María Del Pilar Osorno Suárez

Director

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete

Codirectora

Dra. Mariana Saucedo García

Santiago de Tulantepec de Lugo Guerrero, Hgo., México., marzo del
2026



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DOCTORAL

Evaluación de respuestas fisiológicas y bioquímicas inducidas por
Trichoderma asperellum en la tolerancia al frío en plantas de jitomate
Solanum lycopersicum

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M. en C.: María Del Pilar Osorno Suárez

Director

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete

Codirectora

Dra. Mariana Saucedo García

Asesores

Dra. Ma. Isabel Reyes Santamaría

Dra. Eliazar Aquino Torres

Dra. Diana Sánchez Rangel

Santiago de Tulantepec de Lugo Guerrero, Hgo., México., marzo del
2026



31/Enero/2026

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

El Comité Tutorial de la TESIS del programa educativo de posgrado titulado "Evaluación de respuestas fisiológicas y bioquímicas inducidas por *Trichoderma asperellum* en la tolerancia al frío en plantas de jitomate *Solanum lycopersicum*", realizado por la sustentante **M. en C. Maria del Pilar Osorno Suárez** con número de cuenta **281135** perteneciente al programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias (Modalidad tradicional), una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo a 31 de enero del 2026

El Comité Tutorial

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete
 Director

Dra. Ma. Isabel Reyes Santamaría
 Miembro del comité

Mariana S.G.

Dra. Mariana Saucedo García
 Codirectora

Dra. Eliazar Aquino Torres
 Miembro del comité

Dra. Diana Sánchez Rangel
 Miembro del comité

"Amor, Orden y Progreso"



2025



Av. Universidad No. 133, Col. San Miguel Huatengo,
 Santiago Tulantepec. C. P. 43775. Hidalgo, México
 42090. docagrop@uaeh.edu.mx
 Teléfono: 7717172000 Ext. 42090

uaeh.edu.mx



DEDICATORIA

A las plantas y microorganismos: fuente constante de asombro y conocimiento que dan vida a la investigación científica. En ellos se revelan la resiliencia, la cooperación y la complejidad de la vida. Mi gratitud a cada planta de *S. lycopersicum* que hizo posible este trabajo y de manera especial a *T. asperellum*. Gracias por las lecciones que sin palabras me permitieron aprender.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis: Dra. Mariana y Dr. Alfredo, porque cada uno supo guiarme en este viaje científico, gracias por acompañarme desde su experiencia y comprensión.

A mi Dra. Mariana. Mil gracias Doctora, este logro no habría sido posible sin su inigualable fortaleza, sabiduría e inteligencia, muchas gracias sus enseñanzas, su rigor científico y su generosidad.

A mi comité tutorial del Doctorado: Dra. Ma. Isabel, Dra. Eliazar y Dra. Diana, por su valioso acompañamiento durante todo el proceso, por cada aportación que enriqueció este hermoso proyecto de investigación.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI, antes CONAHCYT) por la beca otorgada con número de CVU: 1013209 que hizo posible la dedicación a tiempo completo de este proyecto de investigación.

A mis amigos. Miles de gracias por su compañía en este caminito de la ciencia, por las comidas juntos, por la fiesta, por darnos ánimo mutuamente en nuestros experimentos, por las risas y por caminar juntos, los llevo siempre en mi corazón.

A mi familia porque son el inicio de toda esta aventura, por la dulzura de su compañía por todo su amor, gracias infinitas por sostenerme amorosamente. Gracias mi Rosita por cuidar de mí, porque desde pequeña cultivó mi curiosidad y siempre es la primera en confiar en mi capacidad; gracias porque me enseña que cada avance es importante, así como en nuestros bordados sobre la manta, cada movimiento con la aguja e hilos de colores se transforma en las flores, hongos, aves e insectos que conforman la maravilla del arte culminado.

A mí saludable agrupación de huesos, sistema nervioso, muscular y endocrino que me sostienen y que en conjunto transportan mi alma, mi pensamiento y mi existencia.

A la diversidad musical que me acompañó en todo el proceso y a la vida misma por inspirarme.

Contenido

1. Resumen	1
Abstrac.....	2
2. Introducción.....	3
2.1. Alteraciones en plantas sensibles a bajas temperaturas	4
2.1.1. Alteraciones fisiológicas.....	4
2.1.2. Alteraciones bioquímicas	4
2.2. <i>Trichoderma</i> spp. como bioinoculantes en la mitigación de daños provocados por estrés abiótico en plantas	16
3. Antecedentes.....	17
4. Justificación	18
5. Objetivos.....	19
5.1. General.....	19
5.2. Específicos	19
6. Hipótesis.....	20
7. Metodología.....	21
7.1. Material biológico.....	21
7.1.1. Obtención de plántulas de jitomate	21
7.1.2. Obtención del inóculo de <i>T. asperellum</i>	21
7.1.3. Inoculación y trasplante de las plantas de jitomate	21
7.1.4. Aplicación del estrés por frío en plantas de jitomate inoculadas con <i>T. asperellum</i>	21
7.2. Efecto del estrés por frío en el crecimiento del hongo <i>T. asperellum</i>	21
7.3. Evaluación del fenotipo de plantas inoculadas con <i>T. asperellum</i> sometidas a estrés por frío	22
7.4. Evaluación de parámetros bioquímicos en plantas de jitomate expuestas a estrés por frío	23
7.4.1. Detección histoquímica de H ₂ O ₂ como indicador de estrés oxidativo	23
7.4.2. Cuantificación de actividad enzimática de la catalasa.....	23
7.4.3. Detección de compuestos osmoprotectores.....	24

7.5.	Evaluación de parámetros estomáticos en plantas de jitomate inoculadas con <i>T. asperellum</i> y expuestas a estrés por frío.....	24
7.5.1.	Densidad e índice estomático	24
7.5.2.	Morfometría de los estomas	25
7.6.	Análisis estadístico	25
8.	Resultados.....	26
8.1.	Evaluación de la viabilidad de <i>T. asperellum</i> ante el estrés por frío	26
8.2.	Efecto de la inoculación con <i>T. asperellum</i> en el fenotipo y sobrevivencia de plantas de jitomate sometidas a estrés por frío	28
8.3.	Evaluación de parámetros bioquímicos en plantas de jitomate expuestas a estrés por frío	30
8.3.1.	Detección histoquímica de H ₂ O ₂ como indicador de estrés oxidativo	30
8.3.2.	Actividad de la enzima catalasa.....	30
8.3.3.	Determinación de prolina	31
8.3.4.	Cuantificación de azúcares totales.....	31
8.4.	Evaluación de parámetros fisiológicos en plantas de jitomate inoculadas con <i>T. asperellum</i> expuestas a estrés por frío.....	33
8.4.1.	Densidad e índice estomático	33
8.4.2.	Morfometría de los estomas	35
9.	Discusión de resultados	36
9.1.	Evaluación de viabilidad de <i>T. asperellum</i> ante el estrés por frío	36
9.2.	Efecto de la bioinoculación de plantas de jitomate con <i>T. asperellum</i> en la disminución de los daños causados por frío	36
9.3.	Evaluación del efecto de <i>T. asperellum</i> sobre parámetros bioquímicos de plantas de jitomate expuestas a estrés por frío.....	37
9.3.1.	Acumulación de H ₂ O ₂	37
9.3.2.	Actividad de la catalasa	37
9.2.3.	Contenido de prolina	38
9.2.4.	Cuantificación de azúcares totales.....	39

9.3. Evaluación de parámetros fisiológicos en plantas de jitomate expuestas a estrés por frío	39
9.3.1. Parámetros estomáticos	39
10. Conclusiones.....	41
11. PERSPECTIVAS	42
12. Bibliografía.....	43
13. ANEXOS	50

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Sitios de generación de ROS y mecanismos de desintoxicación celular.....	5
Figura 1. Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>T. asperellum</i> en medio de cultivo PDA.....	26
Figura 2. Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias en sustrato inoculado con <i>T. asperellum</i>	27
Figura 3. Efecto del estrés por frío en plantas de jitomate con y sin <i>T. asperellum</i>	28
Figura 4. Efecto de la inoculación con <i>T. asperellum</i> en la sobrevivencia de plantas de jitomate ante estrés por frío.	29
Figura 5. Detección histoquímica de H ₂ O ₂ con tinción DAB.	30
Figura 6. Actividad de la catalasa en hojas de jitomate con y sin <i>T. asperellum</i> en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.	31
Figura 7. Contenido de prolina en hojas de jitomate con y sin <i>T. asperellum</i> en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.	32
Figura 8. Azúcares totales en hojas de jitomate con y sin <i>T. asperellum</i> en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.	32
Figura 9. Microfotografías de improntas del envés de hojas de jitomate.....	33
Figura 10. Densidad estomática de hojas de jitomate con y sin <i>T. asperellum</i> en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.	34
Figura 11. Índice estomático de hojas de jitomate con y sin <i>T. asperellum</i> en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.	34
Figura 12. Parámetros morfométricos de estomas de hojas de jitomate con y sin <i>T. asperellum</i> en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.	36

ABREVIATURAS

APX	Ascorbato peroxidasa (Ascorbate peroxidase)
AsA	Ascorbato (Ascorbate)
AOX	Acetil –CoA oxidasa (Acyl-CoA oxidase)
CAT	Catalasa (Catalase)
DHA	Dehidroascorbato (Dehydroascorbate)
GOX	Glicolato oxidasa (Glycolate oxidase)
GSSG	Glutation oxidado (Oxidised glutation)
GSH	Glutation (Reduced glutation)
MDA	Malondialdehído (Malondialdehyde)
PGPR	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant growth promoting rhizobacteria)
POD	Peroxidasa (Peroxidase)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species)
SA	Ácido salicílico (Salicylic acid)
SOD	Superóxido dismutasa (Superoxide dismutase)
UFC	Unidades formadoras de colonias
MAPK	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos (Mitogen activated protein kinases)
ETC	Cadena transportadora de electrones (Electron transport chain)

1. RESUMEN

El estrés por frío limita el desarrollo de plantas de origen tropical y subtropical como el jitomate. Una respuesta común de las plantas sensibles a las bajas temperaturas es la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno, las cuales promueven la oxidación de proteínas, lípidos, ADN y RNA, lo que puede derivar, en última instancia en muerte celular. El hongo *Trichoderma* spp. es un efectivo promotor del crecimiento vegetal y antagonista de fitopatógenos, actualmente se ha explorado su papel como inductor de la defensa vegetal para mitigar efectos negativos del estrés abiótico que suelen afectar la rentabilidad de los cultivos. Esta investigación evaluó el efecto del hongo *Trichoderma asperellum* en plantas de jitomate expuestas a 4 °C en un rango de 3 a 12 días en diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos. Los resultados revelaron que el bioinoculante disminuyó el daño provocado por el frío en las plantas de jitomate, reflejándose en una mayor tasa de sobrevivencia (90.24 %) en comparación con las plantas sin inocular (36.59%) y una menor severidad de la sintomatología provocada por el estrés. Asimismo, se detectó una menor acumulación de H₂O₂ y actividad enzimática de la catalasa en las plantas bioinoculadas bajo estrés, lo que podría estar relacionado con la alta acumulación de osmolitos tales como la prolina y azúcares totales. Interesantemente, este estudio también reveló que *Trichoderma asperellum* modifica parámetros estomáticos al aumentar la densidad e índice estomático y disminuir el tamaño de los estomas. Todos estos hallazgos demuestran diferentes cambios provocados por el agente fúngico asociados en la mitigación del daño por frío y postula su uso como una herramienta viable dentro de la agricultura sustentable para la protección vegetal de cultivos sensibles al frío, especialmente en un contexto de cambio climático.

Abstrac

Cold stress inhibits the growth of tropical and subtropical plants such as tomatoes. A common response of plants sensitive to low temperatures is the production and accumulation of reactive oxygen species, which promote the oxidation of proteins, lipids, DNA and RNA, ultimately leading to cell death. The fungus *Trichoderma* spp. is an effective plant growth promoter and phytopathogen antagonist. Recent research has explored the role of plant defenses responses in the alleviation of negative effects of abiotic stress. In this sense, the present research was aimed at studying the effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants exposed to 4 °C for a period of 3 to 12 days at physiological and biochemical levels. The results revealed that this bioinoculant reduced damage caused by cold in tomato plants, resulting in a higher survival rate (90.24%) compared to non-inoculated plants (36.56%) as well as a lesser severity. Likewise, a lower accumulation of H₂O₂ and catalase enzyme activity was detected in the inoculated plants under stress, which could be related to the high accumulation of proline and total sugars quantified in this study. Interestingly, this also found that *T. asperellum* changed stomatal parameters by increasing stomatal density, stomatal index and decreasing stomatal size. All these results demonstrate different changes caused by the fungal agent associated with the mitigation of cold damage and suggest its use as a viable approach in sustainable agriculture for the plant defense of cold sensitive crops, especially in the context of climate change.

2. INTRODUCCIÓN

Las plantas sustentan la vida humana al proveer de alimento, medicina y materias primas. La diversificación de la vegetación endémica, así como de las especies de interés agrícola se relaciona directamente con las características del clima: precipitación, viento, humedad y temperatura. El clima, por lo tanto, es el conjunto de dichas características atmosféricas durante un tiempo prolongado que otorga ciertas condiciones meteorológicas dominantes de una zona geográfica (Beck et al., 2018).

El clima se clasifica en cinco grupos: tropical, seco, templado, frío y boreal; México presenta un mosaico climático altamente variado debido al relieve montañoso en gran parte del país, de manera que los tipos climáticos presentes responden a lo siguiente: el clima tropical que se caracteriza por temperaturas superiores a los 18 °C y precipitaciones que rondan los 800-4,000 mm al año; el clima seco, con temperaturas extremas entre el día y la noche superiores a 40 °C y menores a 0 °C, respectivamente, y precipitaciones anuales entre los 300-500 mm; el clima templado, con temperaturas entre 12-18 °C y precipitaciones cercanas a 600-1500 mm anuales, el clima frío, con temperaturas menores a 0 °C y finalmente el clima boreal que se caracteriza por presentar descensos de temperatura de hasta los -40 °C y precipitaciones entre los 380-635 mm; si bien en México no se presenta este tipo de clima, las altas montañas y volcanes son las zonas más frías del país clasificados como clima polar de alta montaña (García, 2004).

En México los climas predominantes son el clima seco con el 53.11%, el clima tropical con un 35.85% de la superficie, el clima templado con el 11.04%, y el clima frío con el 0.03% de la superficie (SEMARNAT, 2023)

Los cereales como el trigo, avena y cebada son originarios de climas templados, por lo que predominan en zonas donde la temperatura tiende a ser baja, incluso fría durante la época invernal, contrario a algunas plantas de la familia *Solanacea* como la berenjena y el jitomate, los cuales, al ser originarios de zonas tropicales, se encuentran distribuidos ampliamente en zonas geográficas que presentan climas cálidos. En este sentido, el estrés por frío es una limitante para el desarrollo de una gran variedad de plantas sensibles a las bajas temperaturas, como la calabaza, los espárragos y el jitomate, cuyas afectaciones implican una deshidratación severa, inhibición del crecimiento y estrés oxidativo que, en su conjunto, puede ocasionar la muerte prematura de las plantas y reducir la productividad agrícola (Rodríguez-Pérez, 2006a; Snyder y Melo-Abreu, 2010).

2.1. Alteraciones en plantas sensibles a bajas temperaturas

2.1.1. Alteraciones fisiológicas

La transpiración de las plantas es afectada por el descenso de la temperatura, principalmente porque la tasa de absorción del agua es lenta en comparación a su flujo durante temperaturas cálidas. En la lámina foliar de las plantas se localizan estructuras dinámicas llamadas estomas que son poros epidérmicos conformados por dos células oclusivas con paredes flexibles, y son los responsables de regular la transpiración y el intercambio gaseoso necesario para la fotosíntesis. Los estomas presentan los mismos organelos que el resto de las células vegetales y los cambios de turgencia en las células oclusivas se relacionados con la actividad de sus vacuolas y la difusión del agua mediante ósmosis donde la concentración de iones de K^+ influyen en su actividad: cuando el K^+ está dentro existe mayor turgencia y el estoma se abre, mientras que cuando el K^+ sale la turgencia es menor por lo que el estoma se cierra (Cramer et al., 2011; Hasanuzzaman et al., 2023).

La morfología y anatomía de los estomas varía con la especie vegetal así como del ambiente físico-químico al que están expuestas las plantas, en este sentido el comportamiento dinámico de los estomas se relaciona con la conductancia hidráulica de la planta para que el agua se transporte desde la solución del suelo, a través de las raíces hasta la parte foliar, los estomas son capaces de regular la pérdida de agua hacia la atmósfera como respuesta a condiciones ambientales desfavorables, principalmente cuando la planta tiene una menor disponibilidad de agua, ya sea en condiciones de sequía, salinidad y bajas temperaturas (Hajihashemi et al., 2018; Zárate-Martínez et al., 2021).

2.1.2. Alteraciones bioquímicas

2.1.2.1. El estrés oxidativo en las plantas

El oxígeno molecular (O_2) está presente en aproximadamente el 21% de la composición de la atmósfera terrestre, es un elemento con alta electronegatividad, lo que le permite formar parte de diversas moléculas que favorecen la vida, como el agua y grupos funcionales que conforman la estructura de las biomoléculas. El O_2 es producto de la oxidación del agua durante la fotosíntesis y una de las formas principales de reingresar al sistema de las plantas es en forma de CO_2 como producto de la respiración de los organismos aeróbicos (Camarena-Gutiérrez, 2006; Halliwell, 2006).

El O_2 es una molécula que puede existir de forma libre con dos electrones desapareados en su último orbital, su interacción con otros elementos es restringida debido a que sólo puede aceptar un electrón en cada interacción, esta limitante lo vuelve una molécula que no es tóxica para los organismos aerobios; sin embargo, un aporte de energía incrementa su reactividad y se elimina dicha restricción (Demidchik, 2015).

Cuando el O_2 recibe un electrón se puede generar una molécula inestable altamente reactiva; esta producción de formas parcialmente reducidas o excitadas del O_2 conforman el grupo de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species). Las ROS son subproductos del metabolismo de la célula vegetal en organelos membranales como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Garg & Manchanda, 2009).

La sobreproducción y acumulación de ROS tiene efectos nocivos para la célula vegetal, principalmente porque promueven el estrés oxidativo, lo que provoca la degradación de componentes celulares. Las ROS presentan diferentes niveles de reactividad, así como diversos sitios de generación, entre las ROS de mayor importancia biológica para la célula vegetal se encuentran: el oxígeno singulete (1O_2), el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$) (Tripathy & Oelmüller, 2012) (You & Chan, 2015; Nadarajah, 2020).

El 1O_2 es una especie que reacciona rápidamente con fracciones ricas en electrones, suele formarse cuando una molécula de O_2 ha sido fotooxidada al captar la energía de partículas de luz desde pigmentos fotosintéticos, esta transferencia energética produce un estado de excitación capaz de oxidar los dobles enlaces de lípidos y diversas proteínas ricas en tirosina, histidina, triptófano, metionina y cisteína, además el 1O_2 presenta afinidad por residuos de guanina en el DNA. El 1O_2 puede afectar directamente a los cloroplastos, oxidándolos y transfiriendo su alto estado de energía a otras moléculas promoviendo la formación de más ROS. La eliminación del 1O_2 involucra principalmente a carotenoides y α -tocofenol que logran disipar el exceso de energía (Mittler, 2017; Dmitrieva et al., 2020).

El anión O_2^- , es una forma reducida del O_2 , posee una carga negativa, se produce por la acción de la NADPH oxidasa, principalmente en las cadenas de transporte de electrones tanto en los fotosistemas del cloroplasto como en los complejos de las mitocondrias (Jiménez-Quesada et al., 2016). El O_2^- reacciona con enlaces Fe-S de proteínas, esta ROS se puede transformar en H_2O_2 por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Mittler, 2017).

El H_2O_2 es un ácido débil sin electrones desapareados, por lo que no se considera como un radical libre; sin embargo, al igual que las demás ROS, esta molécula es capaz de promover el estrés oxidativo mediante la oxidación de componentes celulares, especialmente con proteínas que poseen residuos de metionina y cisteína; tiene afinidad con los grupos tiol ($-SH$) de algunas enzimas y afecta su actividad; por lo que el H_2O_2 puede inactivar enzimas clave del metabolismo celular como a la ATP sintetasa en la mitocondria y a la RuBisCo en los cloroplastos. El aumento de la producción de H_2O_2 causa peroxidación de lípidos y como resultado se afecta la composición y funcionamiento de la membrana plasmática y membranas de organelos, el principal producto que evidencia la peroxidación lipídica es el

malondialdehído (MDA) que a su vez causa también daño celular (Garg & Manchanda, 2009; Habibi, 2014).

Los procesos de oxidación y reducción en los organismos vegetales son en sí mismos un constante monitoreo del funcionamiento saludable de las células. La producción de ROS ocurre de manera habitual en las células y se generan como subproductos ya sea a partir de reacciones metabólicas, así como también mediante mecanismos no enzimáticos, como en las cadenas de transporte de electrones (Tripathy y Oelmüller, 2012; Podgórska *et al.*, 2017). El equilibrio entre la producción y la modulación de las ROS por los sistemas antioxidantes de las plantas permite aprovechar las propiedades de las ROS sin comprometer la funcionalidad de los componentes celulares, cubriendo un rol importante como segundos mensajeros o como reguladores del crecimiento vegetal (Guo *et al.*, 2018).

Tabla 1. Sitios de generación de ROS y mecanismos de desintoxicación celular.

ROS	Sitios de producción	Funciones	Daños celulares por acumulación	Mecanismos de eliminación	Referencia
Oxígeno singulete 1O_2	Fotosistema II, cloroplastos	Señalización fotosintética	Peroxidación lipídica, inhibición del PSII, oxidación de proteínas ricas en tirosina, histidina y triptófano	Carotenoides, antocianinas, tocoferoles	Dmitrieva <i>et al.</i> , 2020
Anión superóxido O_2^-	Cadenas de transporte de electrones en cloroplastos y mitocondria, membrana celular	Señalización de muerte celular	Daña los centros Fe-S de proteínas, peroxidación lipídica	Superóxido dismutasa, ascorbato	Sun <i>et al.</i> , 2019
Peróxido de hidrogeno H_2O_2	Peroxisomas, cloroplastos, citosol, apoplasto	Modificación de la pared celular, señalización del estrés.	Peroxidación lipídica, oxida los tioles (-SH) proteicos, daña el ADN.	Catalasa, ascorbato peroxidasa, ciclo del ascorbato-glutation	Chen <i>et al.</i> , 2022
Radical hidroxilo $\bullet OH$	Pared celular, todos los compartimentos celulares	Muerte celular programada	Peroxidación lipídico, daños al ADN/ARN, oxidación de proteínas.	Prolina, azúcares, flavonoides	Guo <i>et al.</i> , 2018

Compartimentalización celular de la generación de especies reactivas de oxígeno

- a) Apoplasto: Las ROS apoplásticas son resultado principalmente de la actividad enzimática de NADPH oxidasa de la membrana plasmática que transfieren electrones al O_2 reduciéndolo a O_2^- . La activación de esta enzima se rige por la información del estado redox de la célula, el reconocimiento de un factor estresante, así como su intensidad, puede provocar la activación de la NADPH oxidasa, iniciando con la translocación de los complejos enzimáticos que la componen, específicamente los componentes citosólicos que migran hacia las subunidades del complejo NADPH asociado a la membrana plasmática, su ensamble involucra la fosforilación de proteínas y generación de ROS, las cuales al ser segundos mensajeros se asocian con diferentes vías de señalización celular como los canales de calcio y la activación de cinasas de proteína activada por mitógenos (MAPK) que influyen en la expresión de genes que codifican para la síntesis de diversas enzimas antioxidantes (Jiménez-Quesada et al., 2016; Sun et al., 2019).
- b) Mitocondria: La producción de ROS en la mitocondria tiene su origen principalmente de los electrones perdidos durante la respiración, en la cadena transportadora de electrones (ETC por sus siglas en inglés: Electron Transport Chain), los electrones reducen el O_2 a O_2^- , del cual también se puede producir H_2O_2 por la enzima SOD mitocondrial o por la ascorbato peroxidasa (APX) (Mignolet-Spruyt et al., 2016). La percepción de una situación de estrés abiótico puede provocar un elevado flujo de electrones ocasionando la inhibición de los complejos I y II de la ETC; como consecuencia, el estado de sus componentes como la ubiquinona reducida puede sufrir autooxidación amplificándose la producción de O_2^- , y perjudicando la síntesis de ATP. La sobreproducción de ROS en la mitocondria puede incrementar la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial causando la liberación de proteínas como el citocromo hacia el citosol afectando directamente el transporte de electrones (Murphy, 2009; Huang et al., 2016).
- c) Cloroplasto: En los cloroplastos se producen niveles elevados de 1O_2 , en las membranas tilacoidales, como consecuencia del exceso de energía fotoquímica durante la transferencia de los fotones captados por las clorofilas hasta los centros de reacción. Entre las condiciones que provocan el exceso de energía se encuentran la elevada radiación fotosintéticamente activa en combinación con situaciones de estrés abiótico; por ejemplo, la deficiencia mineral, la sequía, y las fluctuaciones extremas de temperatura (Shapiguzov et al., 2012; Tripathy & Oelmüller, 2012). Estas condiciones provocan que la disipación de la energía siga tres opciones: la primera corresponde a la liberación en forma de calor del fotón, retornando un nivel de energía

semejante al que fue captado; en segundo lugar, emitir fluorescencia cuando el fotón adquiere una mayor longitud de onda y; en tercer lugar, la transformación de la clorofila en un estado triplete; esto significa que su estado energético se torna mayor al de su estado basal al recibir la energía pero menor al estado funcional de excitación. La clorofila en estado triplete es inestable por lo que reacciona con el O₂ y produce ¹O₂, que es una ROS altamente dañina para la maquinaria fotosintética debido a que oxida rápidamente proteínas y lípidos del cloroplasto, sumado a ello, esta ROS es capaz también de oxidar a ácidos nucleicos lo que en última instancia culmina en muerte celular (Gill & Tuteja, 2010; Dmitrieva et al., 2020). Las diferentes formas de disipación de la luz forman parte de los mecanismos de protección del aparato fotosintético contra la fotoinhibición: cuando se sobrepasa la capacidad de absorción y transformación de la energía luminosa en energía química, la fotoinhibición compromete la funcionalidad de los fotosistemas, especialmente el PSII que es más el más fotosensible (Bieto & Talón, 2008). Mantener las funciones del cloroplasto se relaciona con las adaptaciones morfológicas del propio organelo en respuesta al estrés oxidativo; estas adaptaciones incluyen la mayor formación y agrupación de plastoglobulos, lipoproteínas acopladas en las curvaturas de la membrana de los tilacoides. La importancia funcional de los plastoglobulos radica en su capacidad de albergar en su interior moléculas protectoras de la maquinaria fotosintética como carotenoides, α -tocoferol y plastoquinonas (Austin et al., 2006) (Eugeni, Piller et al., 2014). A pesar de las adaptaciones morfológicas antes mencionadas, los cloroplastos funcionales se caracterizan por mantener una forma externa elíptica, mientras que durante eventos como la fotoinhibición pueden presentar una forma hinchada; este cambio puede impedir su actividad fotosintética y conducir a la clorofagia, un proceso de autofagia selectivo que elimina cloroplastos cuya actividad es disfuncional ya sea por daño oxidativo o por alteraciones en su morfología. El proceso involucra la degradación del cloroplasto, su transporte hacia la vacuola y el reciclaje de nutrientes (Nakamura et al., 2018; Nakamura & Izumi, 2018),

- d) Peroxisomas: La producción de las ROS peroximáticas proviene de la actividad enzimática de la Acetil- CoA oxidasa (AOX), esta enzima es la principal generadora de H₂O₂ durante la β -oxidación de ácidos grasos y algunas moléculas como el ácido benzoico y el ácido 12-oxo fitodienoico, precursores lipofílicos del ácido salicílico (SA) y del ácido jasmónico (JA), respectivamente. (Valdez Sepúlveda et al., 2015; Kao et al., 2018). La AOX actúa sobre los grupos CH-CH de las moléculas lipídicas empleando al O₂ como aceptor de electrones; las ROS como subproductos de tal actividad generalmente son catalizadas en el mismo peroxisoma mediante la actividad

de la enzima catalasa (CAT), mientras que algunas ROS se difunden mediante transportadores de la membrana peroximal para desempeñar un rol en la señalización celular durante episodios de estrés abiótico (del Río & López-Huertas, 2016; Reumann & Bartel, 2016). Las funciones metabólicas del peroxisoma lo convierten en un sitio de numerosas reacciones oxidativas, además en un sitio dinámico para la depuración de H_2O_2 , ya que gracias su plasticidad metabólica logra ajustar su carga enzimática para llevar a cabo el ciclo del ascorbato-glutatión, que es crucial para el metabolismo de desintoxicación del H_2O_2 (Kao et al., 2018). Este ciclo modulador de ROS tiene lugar en diferentes compartimentos celulares además del peroxisoma, ya que los componentes enzimáticos del ciclo del ascorbato-glutatión también se localizan en el cloroplasto, la mitocondria y en el citoplasma (Asada, 2006; Habibi, 2014; Corpas et al., 2020).

Función de las especies reactivas de oxígeno en procesos de elongación y refuerzo de la pared celular

La elongación de las paredes celulares, que tiene origen en el apoplasto, es un proceso mediado por ROS, ya que promueven la pérdida de enlaces en la matriz de la pared; posteriormente a través de la polimerización de la lignina ocurre el endurecimiento de la pared celular (Tripathy & Oelmüller, 2012) (Podgórska et al., 2017), por lo que, los patrones de crecimiento dependerán de la capacidad de la planta para equilibrar sus señales internas y las señales provocadas por el medio ambiente donde se desarrolla y cómo responde a ellas para sobrevivir (Guo et al., 2018).

Una respuesta similar ocurre cuando una planta entra en contacto con un agente patógeno, el H_2O_2 actúa como mediador del entrecruzamiento de lignina que refuerzan la pared celular, sumado a ello el H_2O_2 es fácilmente difundido por lo que actúa como una molécula involucrada en la señalización celular y activación de respuestas de defensa (Zehra et al., 2017).

Señalización celular mediada por especies reactivas de oxígeno

Las ROS cumplen una función como segundos mensajeros debido a la versatilidad de amplificar las señales al interior de las células mediante la oxidación de diversos componentes celulares, evento que en cadena es capaz de provocar la señalización celular (Tripathy & Oelmüller, 2012) (Mignolet-Spruyt et al., 2016).

Por otro lado, cada tipo de ROS presenta diferente potencial para recorrer distancias en el medio celular, así como cierto tiempo de existencia: los aniones superóxido O_2^- presentan un tiempo entre 1-4 μs y una distancia posible de 30 nm, mientras que los radicales $\bullet OH$ tan sólo alcanzan 1 μs y 1 nm; por su parte el H_2O_2 tiene un tiempo de existencia >1 ms y una capacidad

de migración que ronda $>1 \mu\text{m}$. El H_2O_2 al no tener electrones desapareados es una molécula más estable que puede moverse con mayor libertad tanto de forma intercelular como intracelular (Potocký et al., 2007; Mittler, 2017).

Mecanismos de eliminación de las especies reactivas de oxígeno

La eliminación de las ROS involucra sistemas antioxidantes cuya función es mantener la homeostasis redox celular, al mantener a las ROS en un nivel basal no tóxico. Los sistemas antioxidantes están conformados por enzimas del tipo SOD, CAT y peroxidasas (POX); y también por moléculas antioxidantes no enzimáticas tales como flavonoides, clorofila, carotenoides y antocianinas (Zehra et al., 2017; Drobek et al., 2019; Nadarajah, 2020).

En situaciones de estrés, la capacidad de la maquinaria antioxidante, así como el equilibrio entre las múltiples vías de producción de ROS es determinante para la sobrevivencia de la planta; algunas enzimas presentan afinidad hacia ciertos tipos de ROS o complementan la actividad de otra enzima. Aun así, el éxito para la sobrevivencia de las plantas demanda que las vías de señalización y defensa se desarrollen de manera coordinada, con una mínima intervención de los ROS como mensajeros para lograr la activación de repuestas oportunas que permitan la sobrevivencia (Suzuki & Mittler, 2006).

- a) Vías de eliminación enzimática: Las enzimas antioxidantes reducen la afectación de la funcionalidad de los componentes celulares, mediante la modulación y eliminación de ROS (Xu et al., 2010; Zehra et al., 2017). A continuación, se mencionarán las principales enzimas involucradas en la desintoxicación celular de las ROS.
 - i) Superóxido dismutasa: La SOD brinda defensa enzimática al catalizar la dismutación del anión O_2^- a O_2 y H_2O_2 . La actividad de la SOD depende de diferentes cofactores metálicos, entre los que se reconoce: el hierro (Fe^{+3}), el manganeso (Mn^{+3}) o la asociación cobre-zinc (Cu^{+2} - Zn^{+2}) (Podgórska et al., 2017; Zehra et al., 2017). La enzima SOD presenta variantes enzimáticas, es decir isoformas que, dependiendo su ubicación, pueden ser MnSOD mitocondrial, FeSOD plastídica y CuZnSOD que puede ser plastídica, citosólica y apoplástica (Kliebenstein et al., 1998). La SOD apoplástica se ha reportado como la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo ya que actúa específicamente en el apoplasto, en donde se origina un continuo intercambio de sustancias como el vapor de agua y el intercambio de gases involucrados con la transpiración y la fotosíntesis. Se ha reportado que condiciones de estrés abiótico como la salinidad, temperaturas extremas y excesos de radiación influyen los niveles de la actividad de la SOD

apoplástica, lo cual forma parte de la señalización celular en respuesta al estrés debido a que el H_2O_2 producido por esta enzima puede difundirse libremente a través de las membranas e interactuar con moléculas como el ácido abscísico (ABA), SA, JA y Ca^{2+} lo cual puede activar cascadas de señalización como la MAPK, conduciendo eventualmente a mecanismos de protección (Saxena et al., 2016; Qi et al., 2017; Chen et al., 2022)

- ii) Peroxidasas: La defensa enzimática en las plantas incluye a una gran familia de peroxidasas, que son glicoproteínas monoméricas que se caracterizan por poseer un grupo hemo, puentes disulfuro, iones de calcio y péptidos señal en su estructura. Las peroxidasas están relacionadas en procesos vegetales como la lignificación, la defensa contra patógenos y la cicatrización de heridas; las peroxidasas catalizan la oxido-reducción del H_2O_2 . De manera general, la reacción implica una escisión heterocíclica para producir H_2O , así como la transferencia de electrones a partir de un sustrato, el cual puede ser o no de naturaleza fenólica; estas enzimas se albergan en diversos espacios celulares, cómo en el citosol, peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos Pandey et al., 2017; Matos-Trujillo et al., 2017; Czégény & Rácz, 2023). Entre las peroxidasas vegetales, resaltan la CAT, la APX y la glutatión peroxidasa (GPX) (Lazzarotto et al., 2015; Czégény & Rácz, 2023). La CAT está compuesta por cuatro subunidades monoméricas con un grupo hemo en cada una, que es el encargado de su actividad enzimática. Su actividad inicia cuando el H_2O_2 interactúa con aminoácidos del sitio activo de la catalasa en su grupo hemo, lo que provoca una transferencia de protones (H^+) que se sitúa entre los átomos de oxígeno logrando liberar agua, de manera que la catalasa se oxida y se forma un compuesto intermedio conocido como E-Fe^{+4} que al reaccionar con otra molécula de H_2O_2 produce agua y oxígeno. Es así como la CAT vuelve a su estado original para reaccionar con una nueva molécula de H_2O_2 (Sharma et al., 2020). La enzima CAT cumple un papel clave en la reducción del H_2O_2 generado en distintos compartimentos celulares: en peroxisomas y glioxisomas, se encarga directamente de reducir el H_2O_2 producido por la fotorrespiración y la β -oxidación de ácidos grasos. En mitocondrias la CAT contribuye a mantener el equilibrio redox al encargarse del H_2O_2 generado en la cadena respiratoria, mientras que en los cloroplastos participa como defensa contra el H_2O_2 generado durante la fotosíntesis. Finalmente, en el citosol participa regulando los niveles de H_2O_2 que se

- difunden desde otros compartimentos contribuyendo también en procesos de señalización celular (Murphy, 2009; Qi et al., 2017; Mhamdi et al., 2012).
- iii) Ciclo del ascorbato-glutati3n: El ciclo integra la actividad de 4 enzimas: APX, monodehidroascorbato reductasa (MDAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutati3n reductasa (GR), en una serie de reacciones redox donde se elimina el H₂O₂ y se reciclan las mol3culas antioxidantes del ciclo (Corpas et al., 2020). Durante el ciclo puede ocurrir la oxidaci3n del ascorbato (AsA) por una mol3cula de H₂O₂, lo que provoca la formaci3n de monodehidroascorbato (MDHA) y dehidroascorbato (DHA). En este caso, la enzima MDAR devuelve su estado reducido al AsA mediante una mol3cula de NADPH, con la liberaci3n de NADP⁺. Por otro lado, si una mol3cula de H₂O₂ se une al glutati3n, formara glutati3n oxidado (GSSG) y la liberaci3n de una mol3cula de agua, en esta fase del ciclo la enzima GR es qui3n se encarga de mantener al glutati3n de vuelta a su estado reducido usando para ello, al igual que la MDAR, el poder reductor de una mol3cula de NADPH, este ciclo es vital para el preservar el estado redox en la c3lula de manera que se lleva a cabo en los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y en el citosol; las enzimas como la APX se asocian a las membranas y las MDAR y GR se localizan en el citoplasma, mientras que la DHAR est3 presente en ambas localizaciones (del R3o & L3pez-Huertas, 2016; Hern3ndez et al., 2017; Corpas et al., 2020; Kunert et al., 2023).
- a) V3as de eliminaci3n no enzim3tica: La presencia de mol3culas antioxidantes no enzim3ticas como los flavonoides, el α -tocoferol, las quinonas, los carotenoides, las poliaminas, el glutati3n y las fitohormonas como el SA influyen de manera positiva para combatir el estr3s oxidativo (Foyer & Noctor, 2005; Soydam Aydin et al., 2013). Adem3s, es importante mencionar que otras mol3culas como la sacarosa y la prolina colaboran al combatir los efectos del estr3s por fr3o al actuar como crioprotectores, ya que previenen la deshidrataci3n celular y de esa manera protegen prote3nas y membranas (Nayyar et al., 2005).
- i) Antocianinas: Las antocianinas pertenecen a un grupo de pigmentos vegetales de naturaleza fen3lica, cuya bios3ntesis pertenece al metabolismo secundario de las plantas. Su estructura qu3mica se compone de dos anillos arom3ticos: uno benzopir3nico y el otro fen3lico enlazados mediante un enlace β -gluc3sido a un az3car como la glucosa que le confiere solubilidad y estabilidad a la mol3cula. El rol principal de las antocianinas est3 ligado con la pigmentaci3n de flores y frutos a fin de asegurar la dispersi3n de las semillas, seguida de

esta función su presencia está relacionada con la protección antioxidante durante situaciones de estrés biótico y abiótico (Cartaya & Reynaldo, 2001; Gould et al., 2002). Las antocianinas poseen una elevada capacidad antioxidante, estabilizan a las moléculas de ROS mediante la donación de átomos de hidrógeno provenientes de los grupos hidroxilo (OH^-) que componen sus anillos aromáticos, esta transferencia permite la formación de estructuras más estables con lo que se suprime la oxidación de componentes celulares (Apak et al., 2007). Asimismo, las antocianinas retardan la tasa de oxidación en la reacción Fenton mediante la quelación de compuestos metálicos que son partícipes de la producción de ROS (Cartaya, 2001).

- ii) Flavonoides: Los flavonoides también son compuestos fenólicos que poseen dos anillos aromáticos, que están unidos mediante un anillo de pirano y en su estructura se encuentran uno o más grupos OH^- que han sido glucosilados. Los flavonoides, además de ser un grupo importante de pigmentos para la atracción de polinizadores en flores, también están relacionados con la biosíntesis de compuestos astringentes con función repelente de insectos plaga, y como moléculas antioxidantes con alta captación de radicales libres (Bors et al., 1990). El mecanismo de acción de los flavonoides como antioxidantes se asemeja a las antocianinas, al tener la facilidad de donar átomos de hidrogeno a moléculas reactivas.
- iii) Glutati6n: Otra molécula no enzimática relacionada con el control del estrés oxidativo es el glutati6n. La actividad biol6gica del glutati6n influye en la floraci6n y desarrollo de meristemos apicales y radiculares. El glutati6n es un tripéptido conformado por glutamina, cisteína y glicina; está presente en el citosol, cloroplastos, vacuolas, retículo endoplasmático y mitocondrias como la mayor fuente de almacenamiento de azufre, ya que en su estructura posee un grupo sulfhidrilo ($-\text{SH}$) proveniente de la cisteína (Mahmood et al., 2010). El glutati6n participa en la protecci6n contra las ROS mediante la habilidad de ceder electrones a trav6s de la interacci6n de su grupo $-\text{SH}$ y su rápida regeneraci6n (Noctor et al., 2012).
- iv) Ascorbato: El ascorbato es una molécula que, al igual que el glutati6n, incide en el desarrollo vegetal, principalmente en la diferenciaci6n celular y defensa vegetal contra ROS, especialmente contra O_2^- , H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, y OH^- . El ascorbato es sintetizado en mitocondrias y desde ahí puede transportarse a diferentes organelos, tiene mayor presencia en cloroplastos, viaja por difusi6n facilitada y por gradientes electroquímicos. La oxidaci6n del ascorbato funciona como

percepción del equilibrio redox en la célula y con ello se contribuye a la amplificación de la señal ante un evento de estrés (Mahmood et al., 2010). La oxidación del ascorbato MDHA, una vez oxidado ya no puede viajar por difusión como cuando fue sintetizado, sino hasta que se regenere; para ello el MDHA formado se reduce a DHA por la donación de electrones por parte de un citocromo o por una NADH- y finalmente es reducido hasta ascorbato por acción de la enzima DHAR. Es así como vuelve a moverse mediante gradientes de concentración, así como por portadores entre membranas como las vesículas del protoplasto y por transportadores de glucosa (Horemans et al., 2000) (Kramarenko et al., 2006). Ambos antioxidantes, son elementos clave del ciclo ascorbato-glutatión que en conjunto con los respectivos componentes enzimáticos del ciclo brinda protección contra la sobreproducción de O_2^- , H_2O_2 y 1O_2 (Mahmood et al., 2010; Hasanuzzaman et al., 2017; Corpas et al., 2020).

2.1.2.2.Osmoprotectores

Situaciones de estrés abiótico como la salinidad, la sequía, el calor y el frío provocan deshidratación celular, este fenómeno se caracteriza por la pérdida de la turgencia celular, la desorganización de membranas y acumulación de ROS; efectos que en conjunto desencadenan una serie de afectaciones a nivel estructural y de funcionalidad celular. Se ha reportado que algunas plantas responden a la deshidratación celular con la biosíntesis y acumulación de osmoprotectores: moléculas orgánicas generalmente neutras que son compatibles con la bioquímica celular que incrementan el potencial osmótico y brindan estabilidad estructural a proteínas y membranas. Entre los osmoprotectores más reportados de encuentran aminoácidos como la prolina, la glicina betaína y la alanina; así como también azúcares solubles como la fructosa, la sacarosa y la trehalosa (Kido et al., 2019; Mehta & Vyas, 2023).

Prolina

La prolina es un aminoácido no polar que se caracteriza por poseer grupo α -imino que forma un anillo de pirrolidina al enlazarse con el carbono de su cadena lateral, lo que le confiere una estructura estable. La biosíntesis de la prolina ocurre en el citosol y en el cloroplasto; se ha reportado que en condiciones de estrés abiótico suele acumularse como un osmoprotector de las células vegetales; entre los mecanismos de acción de la prolina se encuentra su acumulación en el citoplasma para reducir el potencial hídrico intracelular evitando así la pérdida excesiva de agua. Por otro lado, la prolina funciona como un estabilizador de las proteínas y de membranas, con las primeras mediante la interacción con las superficies

polares y con las segundas como un estabilizador osmótico interactuando con las cabezas polares de los fosfolípidos, manteniendo la estabilidad de la membrana (Delauney & Verma, 1993; Hosseinifard et al., 2022a; Raza et al., 2023a).

El estrés abiótico como el calor, la salinidad y el frío inhiben el desarrollo vegetativo de las plantas por la reducción del transporte de nutrientes desde la matriz del suelo y la distribución de fotoasimilados durante el estrés, en este sentido la prolina juega un rol importante como reserva de nitrógeno y carbono, elementos que las plantas pueden asimilar durante y después del estrés impactando positivamente en la recuperación de las plantas (Mattioli et al., 2009; Kaur et al., 2011).

Por otro lado, se ha reportado que la aplicación exógena de prolina disminuye la acumulación de H_2O_2 en plantas de tabaco sometidas a salinidad; el efecto protector de la prolina actúa de manera indirecta contra las ROS debido a que la prolina interactúa con regiones hidrofóbicas de proteínas antioxidantes como la SOD, promoviendo la hidratación y la estabilización proteica (Banu et al., 2010; Mattioli et al., 2009; Hosseinifard et al., 2022b).

Azúcares solubles

Las plantas, como organismos autótrofos, son capaces de sintetizar compuestos orgánicos a partir del proceso de fotosíntesis. Entre los principales productos de esta vía metabólica se encuentran los carbohidratos simples como la glucosa, la fructosa y la sacarosa, los cuales constituyen una fuente primaria de energía para las reacciones del metabolismo celular. Desde un punto de vista estructural los azúcares pueden clasificarse en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, esto de acuerdo con la longitud de sus cadenas carbonadas, mientras que la presencia o ausencia de determinados grupos funcionales confiere a estas moléculas propiedades químicas específicas, entre ellas la capacidad de actuar como agentes reductores (Hernández-Bernal et al., 2022; Nawaz et al., 2025).

Los azúcares reductores, como la glucosa y la fructosa, poseen respectivamente un grupo aldehído (-CHO) y un grupo cetona (C=O) libre, lo que les permite donar electrones en reacciones de óxido-reducción. En contraste, moléculas como la sacarosa formada por la unión de una glucosa y una fructosa, no presentan esta capacidad. Esto se debe a que ambos grupos funcionales se encuentran enlazados mediante un enlace glicosídico entre sus carbonos anoméricos de cada monosacárido, lo cual genera una ciclación estable que impide la existencia de los grupos funcionales libres (Mathews et al., 2002; Lastdrager et al., 2014)).

2.2. *Trichoderma* spp. como bioinoculantes en la mitigación de daños provocados por estrés abiótico en plantas

Trichoderma es un hongo saprófito de vida libre que habita numerosos ecosistemas desde praderas, bosques y desiertos, posee la habilidad de reconocer su entorno de manera que se adapta fácilmente al medio de su crecimiento (Alfiky & Weisskopf, 2021; Tyśkiewicz et al., 2022). *Trichoderma* prefiere suelos ácidos por lo tanto, de ser necesario, reduce el pH mediante la secreción de ácido glucónico, cítrico y fumárico (Sood et al., 2020). Tras la modificación del pH de la rizósfera se produce un cambio en la dinámica del suelo, especialmente en la solubilización de fosfatos mediante la producción de ácidos orgánicos o por la acción de enzimas como las fosfatasas liberadas por *Trichoderma*, también se mejora la disponibilidad de nutrientes como Cu, Zn, P y K; además de la formación de sideróforos que son capaces de quelar al Fe (III), que posteriormente se reduce a Fe (II), una forma más soluble y asimilable por las raíces de las plantas que habitan el ecosistema en donde se establece *Trichoderma* (Alfiky & Weisskopf, 2021; Bononi et al., 2020).

Trichoderma tiene la habilidad de generar un vínculo estrecho con las raíces de las plantas mediante la formación de una simbiosis; sin embargo, durante el contacto inicial la planta reconoce a *Trichoderma* como un potencial invasor de manera que, como respuesta refuerza su pared celular y desencadena una serie de respuestas de defensa que incluye la producción de fitohormonas como el ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) que modulan la interacción mientras que, el hongo produce enzimas celulíticas que degradan la pared celular de las raíces para lograr una fijación física mediante los apresorios (Sood et al., 2020; Strakowska et al., 2014; Suriani Ribeiro et al., 2019). Posteriormente, se establece una modulación hormonal que mantiene el contacto hongo-planta en las primeras capas de las raíces circundando la rizósfera, el hongo logra obtener una fuente de carbono adicional en lugar de obtenerlo únicamente de la materia orgánica del suelo además de obtener un nicho de crecimiento y la planta es estimulada para producir hormonas relacionadas con la defensa y el crecimiento vegetal (Contreras-Cornejo et al., 2016; Sood et al., 2020; Tyśkiewicz et al., 2022).

Entre los componentes que las cepas de *Trichoderma* produce se encuentran moléculas análogas de fitohormonas que promueven el crecimiento vegetal como el ácido indol-3-acético (IAA), indole-3-etanol (IET), indol-3-acetaldehído (IALD) y el indol-3-carboxaldehído (ICALD), las cuales inducen respuestas morfogénicas en las plantas inoculadas que se traducen en una mayor ganancia de biomasa total (Hidangmayum & Dwivedi, 2018).

3. ANTECEDENTES

El uso de microorganismos simbioses apunta ser una herramienta viable para la protección de cultivos agrícolas vulnerables al estrés abiótico, el hongo *Trichoderma* spp. ha producido un interés particular en la comunidad científica por ser un eficiente promotor del crecimiento vegetal y por inducir sistémicamente una defensa vegetal que conducen a mitigar o reducir los efectos dañinos de diferentes tipos de estrés abióticos. Por ejemplo, *T. harzianum* incrementa el contenido prolina en plantas de *Brassica juncea* expuestas a estrés salino (Ahmad et al., 2015); *T. harzianum* incrementa la actividad enzimática de la SOD y POD y el contenido de prolina y azúcares totales en plantas de *Saccharum officinarum* sometidas a sequía (Scudeletti et al., 2021) y *T. koningii* disminuye la producción de H₂O₂ en plantas de *Solanum lycopersicum* durante estrés por choque térmico a 45 °C (Tripathi et al., 2021).

Estudios recientes indican que *T. longibrachiatum* eleva la acumulación de prolina, proteínas y azúcares solubles en plántulas de *Pinus massoniana* bajo sequía (Yu et al., 2023); la inoculación dual con *T. afroharzianum* y *T. simmonsii* incrementa el potencial fotosintético y el contenido de clorofila en plantas de *Zea mays* y *Helianthus annuus* durante estrés por sequía (Csótó et al., 2024); *T. harzianum* mejora la ganancia de biomasa, promueve la actividad de SOD, APX y estimula la producción de metabolitos secundarios en plantas de *Zea mays* en estrés combinado por sequía y salinidad (Eftekhari et al., 2025).

Se ha reportado, que el uso de *T. harzianum* y *T. asperellum* favorecen la mitigación de daño por frío en plantas de *S. lycopersicum* al mantener los procesos de crecimiento, y disminuir la fuga de electrolitos (Cornejo-Ríos et al., 2021; Ghorbanpour et al., 2018). En el caso de *T. harzianum* se redujo la peroxidación lipídica y se incrementó en el contenido de prolina en plantas de *S. lycopersicum* estresadas con 8°C por 6 días (Ghorbanpour et al., 2018), mientras que *T. asperellum* conservó el índice de crecimiento, el área foliar y biomasa en plantas de *S. lycopersicum* en comparación con planta no estresadas, y disminuyó significativamente la fuga de electrolitos, prueba que se relaciona con la integridad de la membrana celular bajo este tipo de estrés (Cornejo-Ríos et al., 2021).

La eficacia de la asociación entre microorganismos simbioses y plantas está ligada a la permanencia de éstos en el suelo. El movimiento del agua en el suelo puede disminuir la concentración inicial de los microorganismos aplicados, principalmente por efecto de lixiviación. En consecuencia, las formulaciones biológicas requieren de elementos adherentes que aseguren la permanencia del organismo simbiote. En este sentido la formulación desarrollada por Herrera-Téllez et al. (2019) retiene a *T. asperellum* al menos 40 días, al incluirse una fuente mineral inerte y altamente adherible (caolín).

4. JUSTIFICACIÓN

Diversas regiones del hemisferio norte, incluida la República Mexicana, son propensas a experimentar descensos drásticos de temperatura por el desplazamiento de masas de aire frío proveniente del polo. En los últimos años, la prevalencia e intensidad de los frentes fríos, heladas, nevadas y precipitaciones han ido en aumento por el cambio climático (CONAGUA, 2024; Mitchell et al., 2012; Wills et al., 2019).

El estrés por frío que experimentan las plantas es un factor limitante para la producción masiva de los cultivos. Para revertir este problema, algunos productores optan por el uso de sistemas de calefacción en invernaderos durante la época invernal; sin embargo, además del consumo energético elevado (32,228.76 kWh) en invernaderos ubicados en la zona centro del país que encarece productos que se ofrecen al mercado (Aguilar-Rodriguez et al., 2020; Flores-Velázquez et al., 2022), la inversión y mantenimiento de los sistemas de calefacción representa un acceso limitado de esta tecnología para un gran número de productores.

Una alternativa para aminorar los daños provocados por el frío en las plantas es el uso de bioinoculantes promotores del crecimiento vegetal (Bhupenchandra et al., 2022; Kumari et al., 2023; Mandal et al., 2023), el cual resulta más viable por su costo y por su bajo impacto ambiental.

A pesar de que los bioinoculantes en el campo agrícola tiene más de un siglo de antigüedad, aún permanecen sin ser cabalmente dilucidados los mecanismos de acción de los microorganismos durante la interacción con las plantas. Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo dilucidar algunos de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que desencadena *T. asperellum* sobre las plantas de jitomate y que resulta en un fenotipo de incremento de tolerancia ante el estrés por frío. Los resultados podrán brindar el fundamento científico para sustentar prácticas dirigidas al desarrollo de una agricultura sustentable en un entorno ambiental cada vez más oscilante.

5. OBJETIVOS

5.1.General

Evaluar las respuestas fenotípicas, fisiológicas y bioquímicas involucradas en la tolerancia al frío inducido por *T. asperellum* en plantas de jitomate.

5.2.Específicos

1. Evaluar el efecto del estrés por frío sobre el crecimiento radial del hongo *T. asperellum in vitro*; así como evaluar su viabilidad en el sustrato, mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC).
2. Evaluar el efecto de *T. asperellum* en la respuesta fenotípica y sobrevivencia de plantas de jitomate expuestas a estrés por frío, en relación con plantas no inoculadas.
3. Evaluar el efecto de *T. asperellum* en el estrés oxidativo de plantas de jitomate expuestas a estrés por frío, mediante la cuantificación de ROS y actividad enzimática antioxidante.
4. Determinar los niveles endógenos de compuestos osmoprotectores en plantas de jitomate inoculadas con *T. asperellum* bajo la condición estresante, a través de la cuantificación de azúcares totales y prolina.
5. Evaluar el efecto de *T. asperellum* en los estomas, mediante la densidad e índice estomático, así como sobre la morfometría de los estomas de las hojas de estudio.

6. HIPÓTESIS

La inoculación con *T. asperellum* promueve la tolerancia ante el estrés por frío en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), al inducir respuestas fenotípicas, fisiológicas y bioquímicas que favorecen la sobrevivencia, mediante la eficiencia de los sistemas antioxidantes, mitigación del estrés oxidativo y la acumulación de metabolitos osmoprotectores como la prolina y los azúcares totales, manteniéndose la viabilidad del hongo asegurando una interacción simbiótica funcional y duradera en condición de estrés.

7. METODOLOGÍA

7.1. Material biológico

7.1.1. Obtención de plántulas de jitomate

La siembra de semillas de jitomate variedad Vita, se realizó en almácigo compuesto de una mezcla de peat moss (Sunshine, Canada) y vermiculita (Termolita A.A.P.I de C.V., México) en una relación de 7:3 (v/v) e hidratado a capacidad de campo. Las plantas recién germinadas se mantuvieron a temperatura ambiente ($\approx 30\text{ }^{\circ}\text{C}/\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ día/ noche), el fotoperiodo fue de 16 h de luz natural y 8 h de obscuridad, las plantas fueron regadas a diario con agua de grifo (Herrera-Téllez et al., 2019).

7.1.2. Obtención del inóculo de *T. asperellum*

La cepa de *Trichoderma asperellum* se obtuvo del Centro de Biotecnología Genómica (IPN), México, el hongo creció en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA, Sigma-Aldrich, USA) en cajas Petri. Una vez cubierto el PDA con crecimiento micelar, se utilizaron las cajas para la obtención de una suspensión de conidios de *T. asperellum*. Posteriormente, se preparó un sustrato semisólido compuesto de avena para ser inoculado con la suspensión fúngica a una concentración de 10^5 conidios/mL y se incubó a temperatura ambiente hasta la invasión total del sustrato con el hongo (Herrera-Téllez et al., 2019).

7.1.3. Inoculación y trasplante de las plantas de jitomate

Tres semanas después de la emergencia de las plántulas de jitomate, éstas se trasplantaron en macetas plásticas y se agruparon en dos grupos: uno que contenía plantas que no fueron inoculadas con *T. asperellum* y el otro que contenía plantas inoculadas. Las plantas se mantuvieron en invernaderos separados y se regaron con la solución nutritiva a base de: P_2O_5 , K_2O , N, K_2O , MgO, S y Ca (Herrera-Téllez et al., 2019).

7.1.4. Aplicación del estrés por frío en plantas de jitomate inoculadas con *T. asperellum*

Tres semanas después del trasplante, las plantas de jitomate se dividieron aleatoriamente en dos subgrupos de plantas: uno cuyas plantas continuaron su crecimiento a temperatura ambiental y el otro en el que las plantas fueron sometidas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El estrés térmico se mantuvo durante 12 días para la evaluación de diferentes parámetros (Cornejo-Ríos et al., 2021).

7.2. Efecto del estrés por frío en el crecimiento del hongo *T. asperellum*

Para evaluar si el crecimiento de *T. asperellum* en condiciones de frío se veía afectado, se evaluó su sobrevivencia bajo dos estrategias experimentales; *in vitro* e *in situ*. Para el primer caso, se inoculó el hongo (disco de 0.5 cm de PDA con crecimiento micelial del hongo) y se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Posteriormente, las cajas se separaron en dos grupos: el primero

continuó en incubadora y el segundo grupo se colocó a 4 °C. El crecimiento radial se midió a las 24, 48 y 72 h para cada condición térmica. Finalmente, las cajas que fueron sometidas a estrés por frío se llevaron a incubadora y se conservaron durante 7 días a 30 °C para evaluar su recuperación, tomando como criterio su crecimiento radial.

Para el estudio *in situ*, se pesó 1 g de una muestra compuesta a partir de sustrato rizosférico de 3 plantas de jitomate inoculadas con *T. asperellum*, expuestas o no a 4 °C por 0, 3, 6, 9 y 20 días. Las muestras independientes se mezclaron con solución salina isotónica (Cloruro de sodio 0.9 %, PiSA, México) en una relación 1:100 y se llevaron a un agitador orbital durante 15 minutos. Posteriormente se realizó una serie de diluciones que fueron inoculadas en PDA con rosa de bengala (50 mg/L, HYCEL., México), ácido láctico (1 mL/100 mL) y cloranfenicol (10 µg/ mL, AMRESCO) (Beuchat, 1992; Soutton 2011). El cálculo de las UFCs se realizó a los tres días de incubación mediante la fórmula 1 y se expresó como UFC/g de sustrato:

Fórmula 1

$$\frac{UFC}{g} \text{ de sustrato} = (NC \times \frac{1}{FD} \times \frac{1}{V}) / (P \times FH)$$

Dónde:

NC=Número de colonias en placa

FD= Factor de dilución

V=Volumen inoculado expresado en mL

P=Peso de la muestra húmeda expresado en gramos

FH=Factor de corrección de humedad (1– (%humedad/100))

7.3. Evaluación del fenotipo de plantas inoculadas con *T. asperellum* sometidas a estrés por frío

Con el objetivo de evaluar la tolerancia al frío en plantas de jitomate se calculó el índice de severidad del daño y porcentaje de sobrevivencia en plantas de jitomate con y sin *T. asperellum* expuestas 12 días a bajas temperaturas y retornadas a invernadero para su recuperación. Para el índice de severidad se elaboró una escala arbitraria, con los niveles del 0-4, donde 0, 1, 2, 3 y 4 representan 0, 25, 50, 75 y 100% de daño, respectivamente. El cálculo de severidad se realizó siguiendo la fórmula 2:

Fórmula 2

$$\text{Índice de severidad} = \frac{(\text{Número de plantas en el nivel})}{\text{Total de plantas evaluadas}} \times 100$$

Para el porcentaje de sobrevivencia (fórmula 3), las plantas se consideraron vivas cuando éstas presentaban tallo firme, hojas y ápices verdes y turgentes, y muertas cuando las hojas y ápices se encontraban en punto de marchitez permanente y necrosadas acompañado o no de colapso del tallo (Dat et al., 1998).

Fórmula 3

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{\text{Número de plantas vivas}}{\text{Número de plantas totales}} \times 100$$

7.4. Evaluación de parámetros bioquímicos en plantas de jitomate expuestas a estrés por frío

7.4.1. Detección histoquímica de H₂O₂ como indicador de estrés oxidativo

Se realizó la detección de H₂O₂ por tinción con 3-3'-diamino bencidina (DAB), bajo la premisa de que el DAB forma un precipitado color marrón al reaccionar con la molécula del H₂O₂, de manera que la intensidad de la pigmentación se relaciona con el contenido de H₂O₂ en las células. Para ello, se escindieron hojas de plantas de jitomate inoculadas y no inoculadas con *T. asperellum* crecidas tanto en condiciones de invernadero como de aquellas sometidas a estrés por frío y se expusieron en una solución DAB (1 mg/mL pH 3.8) durante 2 h. Posteriormente, las hojas fueron decoloradas en etanol (96%) e hidratadas en glicerol, agua destilada y ácido acético (70:20:10). Las muestras fueron montadas en portaobjetos para su registro fotográfico (Thordal-Christensen et al., 1997).

7.4.2. Cuantificación de actividad enzimática de la catalasa

7.4.2.1. Obtención de extractos proteicos de plantas de jitomate

Los extractos proteicos crudos se obtuvieron a partir de tejido foliar de los diferentes tratamientos a través de su homogenización en un buffer de fosfato (0.1 M pH: 7.4) suplementado con 2% de polivinil pilirolidona PVPP y 1 mM de EDTA. El extracto se centrifugó a 4 °C a 12000 rpm por 20 min y se almacenó a -75 °C hasta su uso. El contenido de proteínas de los extractos se realizó mediante el método espectrofotométrico de Bradford a 595 nm, usando Albumina de suero bovino (BSA) como estándar. El contenido de proteína fue expresado en microgramos de proteína por microlitros de extracto (µg/mL)

7.4.2.2. Cuantificación de la actividad de catalasa

La actividad de la enzima catalasa se determinó en los extractos proteicos obtenidos anteriormente. Para la prueba se usó un rango de 25-50 µL del extracto enzimático en buffer de fosfatos (50 mM, pH: 7) para dar un volumen final de 2 mL. La reacción comenzó con la adición de 1 mL H₂O₂ (30 mM) y se midió su absorbancia a 240 nm (PG Instruments; T60 UV- Visible spectrophotometer) en un rango de tres minutos. La actividad se calculó siguiendo la fórmula 4 y se expresó como unidades CAT/ mg de proteína (Aebi, 1984).

Fórmula 4

$$\text{Actividad CAT} = \frac{(At0 - At3)}{t (3 \text{ min})} \times \frac{\text{Volumen del buffer de extracción}}{(\text{Coeficiente de extinción molar}) (V \text{ extracto}) (\text{mg de proteína})}$$

7.4.3. Detección de compuestos osmoprotectores

7.4.3.1. Determinación de prolina

Se tomaron 100 mg de peso fresco de cada planta en los diferentes tratamientos y se homogenizó con ácido sulfosalicílico al 3%, el homogenizado se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 6000 rpm (Prism Mini Centrifuge. Labnet), rescatando el sobrenadante. Este último fue mezclado con ácido sulfosalicílico (3%), ácido acético glacial y ninhidrina e incubado a 96 °C, durante 60 min en un Heat block (AccuBlock™, Digital Dry Bath, Labnet). Terminada la reacción se añadió tolueno para la separación de fases, se recuperó el cromóforo y se midió su absorbancia a 520 nm. La concentración de prolina se calculó siguiendo la fórmula 5 y expresó como µg prolina/g de peso fresco.

Fórmula 5

$$\text{Prolina} \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = \frac{\text{Volumen final de reacción}}{\text{Volumen del extracto}} \times \frac{\text{Volumen de la solución de extracción}}{\text{Peso fresco}}$$

7.4.3.2. Determinación de azúcares totales

0.1 g de tejido vegetal fue mezclado con etanol al 80% e incubado a 30 °C durante 30 min. La mezcla se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos, recuperando el sobrenadante. El pellet fue resuspendido nuevamente con etanol y se llevó a incubación y centrifugación en los tiempos antes señalados. El sobrenadante recuperado se mezcló con el anterior. Al 1 mL sobrenadante, previamente diluido, se le adicionaron 4 mL de antrona y se mantuvo en hielo durante 5 minutos y posteriormente a 96 °C por 10 min en un Heat block. Para detener la reacción se colocaron las muestras en un baño de hielo y posteriormente se midió su absorbancia a 620 nm. Se usó glucosa como solución de referencia para la curva de calibración, el procedimiento se desarrolló de igual manera que las muestras. La concentración de azúcares totales se calculó siguiendo la fórmula 6 expresándose como µg azúcares/ g de peso fresco.

Fórmula 6

$$\text{Azúcares totales} \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = \frac{\text{Volumen final de reacción}}{\text{Volumen del extracto}} \times \frac{\text{Volumen de la solución de extracción}}{\text{Peso fresco}}$$

7.5. Evaluación de parámetros estomáticos en plantas de jitomate inoculadas con *T. asperellum* y expuestas a estrés por frío

7.5.1. Densidad e índice estomático

Para la evaluación de los estomas, se seleccionó la parte media de folíolos de plantas con y sin *T. asperellum* crecidas en condiciones de invernadero o a 4 °C y se les aplicó una capa uniforme de esmalte transparente. Tras 5 min de secado se recuperó la impronta con cinta

adhesiva transparente y se montó sobre un portaobjetos. Las improntas se observaron con microscopio óptico (40x) y se capturaron fotografías que se exportaron al software Image J. El área de observación consistió en 0.159 mm² usando un micrómetro de platina como referencia métrica. La densidad estomática se calculó con la fórmula 7 y se expresó como número de estomas/mm², mientras que para determinar el índice estomático se empleó la fórmula 8 y se expresó como porcentaje (Wilkinson, 1979; Awan & Murtaza, 2016; Farber et al., 2016).

Fórmula 7

$$\text{Densidad estomática} = \frac{\text{Número de estomas}}{\text{Área del campo de observación (mm}^2\text{)}}$$

Fórmula 8

$$\text{Índice estomático} = \frac{\text{Número de estomas}}{(\text{Número de estomas} + \text{Número de células epidérmicas})} \times 100$$

7.5.2. Morfometría de los estomas

Para la medición de parámetros estomáticos se evaluaron 30 campos de visión por condición y 100 estomas aleatorios, las microfotografías se exportaron al Software Image J, como referencia métrica se usó un micrómetro de platina, en el estoma se midió la longitud y el ancho para calcular el área del estoma de acuerdo con la fórmula de un elipse. Los resultados se expresaron en mm² (Savvides, et al., 2011; Hajihashemi et al., 2018).

7.6. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron con tres o más replicas biológicas, a partir de dos o más experimentos independientes, los resultados se analizaron utilizando el software estadístico Minitab® 18 las comparaciones de medias se realizaron utilizando la prueba Honestly Significant Difference (HSD) de Tukey en el mismo software, a excepción de la sobrevivencia de las plantas ante estrés cuyos resultados fueron comparados con la prueba *t*-student con un nivel de significancia de $p < 0.05$ en el Software Microsoft Excel.

8. RESULTADOS

8.1. Evaluación de la viabilidad de *T. asperellum* ante el estrés por frío

Para evaluar la viabilidad de *T. asperellum in vitro* durante el estrés por frío, se midió el crecimiento radial del hongo al finalizar el periodo de frío, y posteriormente al ser retornado a incubadora. En la Figura 1A se muestran fotografías representativas del crecimiento de *T. asperellum* en condiciones *in vitro*, mientras que en la Figura 1B se representa el crecimiento radial (mm) del hongo a las diferentes condiciones. Los resultados indican que el crecimiento radial *T. asperellum* durante el estrés a 4 °C fue inhibido significativamente respecto al crecimiento observado a 30 °C. Finalmente, el hongo fue capaz de continuar su crecimiento al retornar a dicha temperatura.

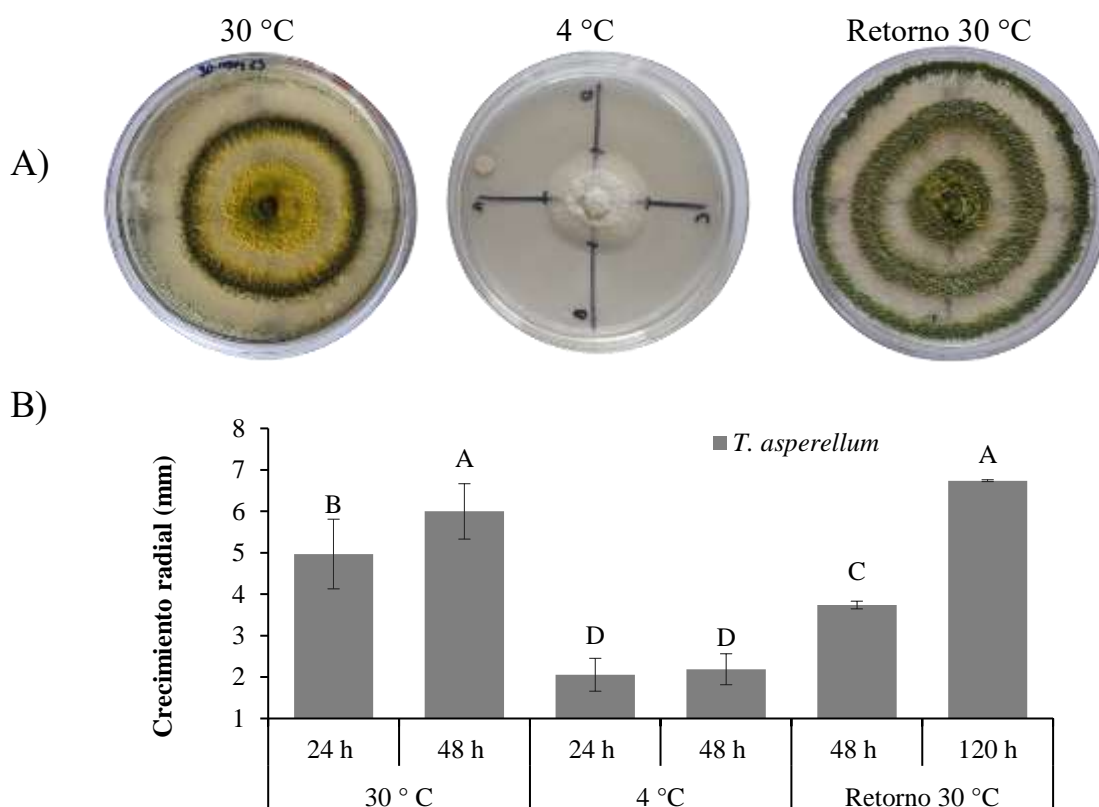


Figura 1. Crecimiento *in vitro* de *T. asperellum* en medio de cultivo PDA.

A) Cajas Petri con crecimiento fúngico de izquierda a derecha; 30 °C, 4 °C y retorno a 30 °C. La fotografía representativa de cuatro experimentos independientes, muestras por triplicado se capturó a las 48 h en cada condición representada. B) Crecimiento radial de *T. asperellum* expresado en milímetros. Cada columna en las gráficas representa el promedio con desviación estándar, 4 experimentos independientes, muestras por triplicado. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$

En cuanto a la viabilidad de *T. asperellum* en el sustrato se cuantificó el número de esporas del hongo en sustrato rizosférico de plantas inoculadas crecidas bajo invernadero o a 4 °C. La Figura 2-A muestra una comparación representativa del medio de cultivo PDA adicionado con Rosa de Bengala como elemento contrastante para el conteo de UFCs de *T. asperellum*, los resultados de la cuantificación de las UFCs que se observan en la Figura 2-B revelaron que *T. asperellum* sobrevivió en el sustrato durante el estrés a 4 °C y las UFCs del sustrato se mantuvieron en 1.7×10^7 UFC/ g de sustrato en ambas condiciones térmicas y en todos los días evaluados.

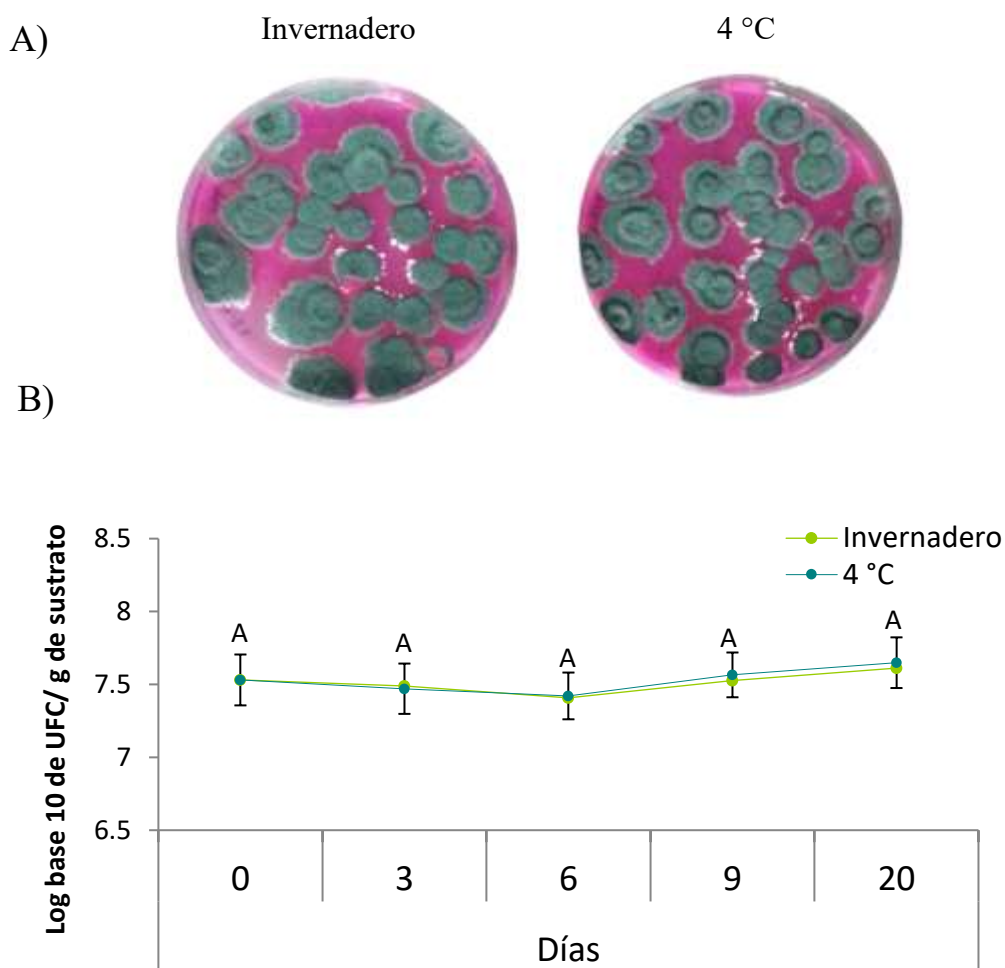


Figura 2. Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias en sustrato inoculado con *T. asperellum*. A) Cajas de cultivo con medio de cultivo PDA, la izquierda corresponde a sustrato proveniente de plantas en invernadero y a la derecha sustrato de plantas con estrés 4 °C. Fotografía representativa de cuatro experimentos independientes, muestras por triplicado. B) Unidades Formadoras de Colonias por gramo de sustrato inoculado con *T. asperellum* desde el día 0 al día 20 proveniente de plantas en invernadero y con estrés 4 °C. Cada punto en la gráfica representa el promedio con desviación estándar, 4 experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$

8.2. Efecto de la inoculación con *T. asperellum* en el fenotipo y sobrevivencia de plantas de jitomate sometidas a estrés por frío

Con el objetivo de evaluar la severidad del daño causado por frío en plantas de jitomate con y sin *T. asperellum*, se elaboró una escala arbitraria (Fig. 3A) y se clasificaron las plantas en su nivel correspondiente.

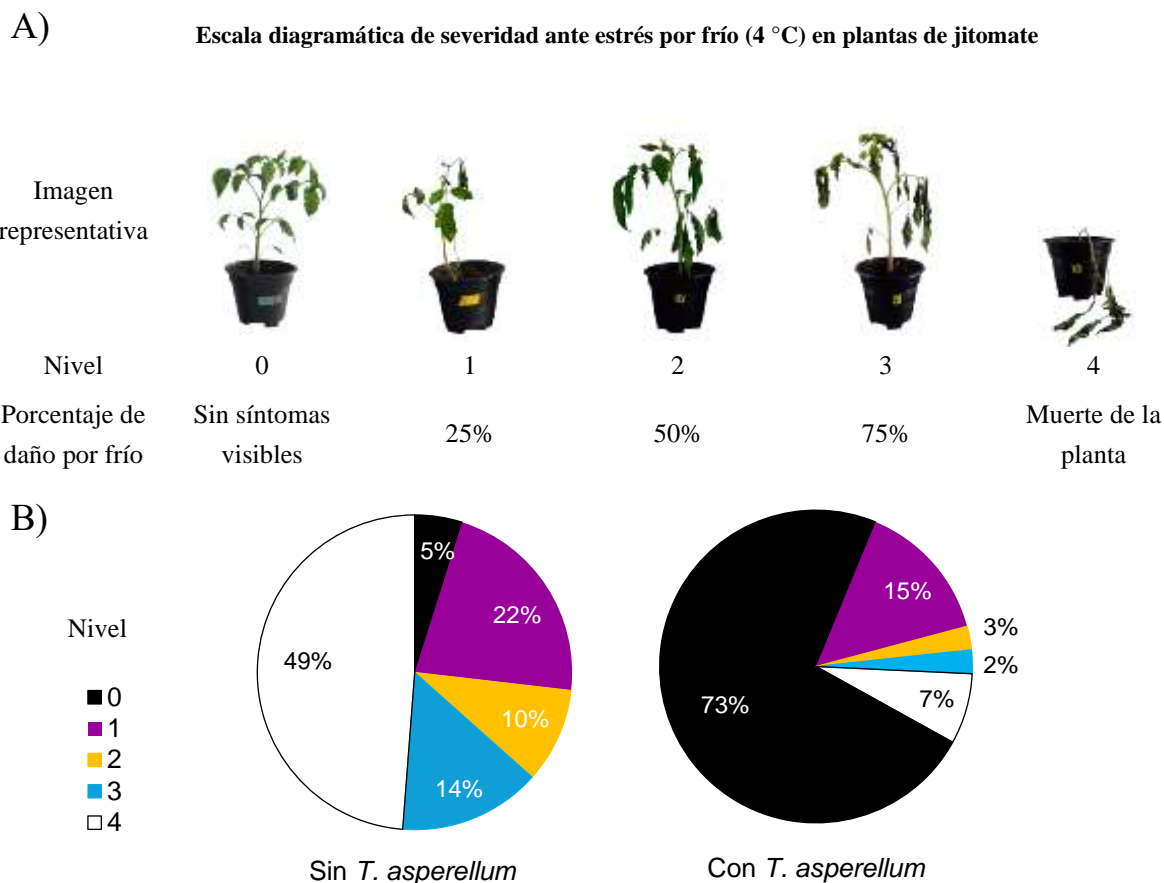


Figura 3. Efecto del estrés por frío en plantas de jitomate con y sin *T. asperellum*.

A) Escala de severidad, B) Índice de severidad de plantas de jitomate con y sin *T. asperellum* en estrés (4 °C) tras su retorno a invernadero (1 semana después del estrés).

La evaluación del fenotipo se realizó tras una semana del retorno de las plantas al invernadero, con una población de 41 plantas por cada condición, derivadas de 7 experimentos independientes. En la Figura 3-B se muestran los resultados del índice de severidad en donde las plantas sin inocular registraron el mayor nivel severidad (48.8%), seguido del nivel 1 (22%) y 3 (14.6%), lo que refleja una alta susceptibilidad al estrés por frío. En contraste, en las plantas con *T. asperellum* la mayor proporción se concentró en el nivel 0 (73.2%), seguidos de los niveles 3 y (2.4 y 7.3% respectivamente).

La tasa de sobrevivencia se calculó mediante la Fórmula 3. En la Figura 4A se muestra una fotografía representativa de plantas de jitomate tras una semana de recuperación del estrés por frío, mostrando a la izquierda un grupo representativo de plantas sin *T. asperellum* y a la derecha un grupo de plantas inoculadas con *T. asperellum*, como puede apreciarse en la Figura 4B las plantas sin *T. asperellum* presentaron el 36.59% de sobrevivencia, mientras que las plantas inoculadas alcanzaron un 90.24 %, evidenciando una mayor tolerancia ante el estrés por frío en presencia del hongo.

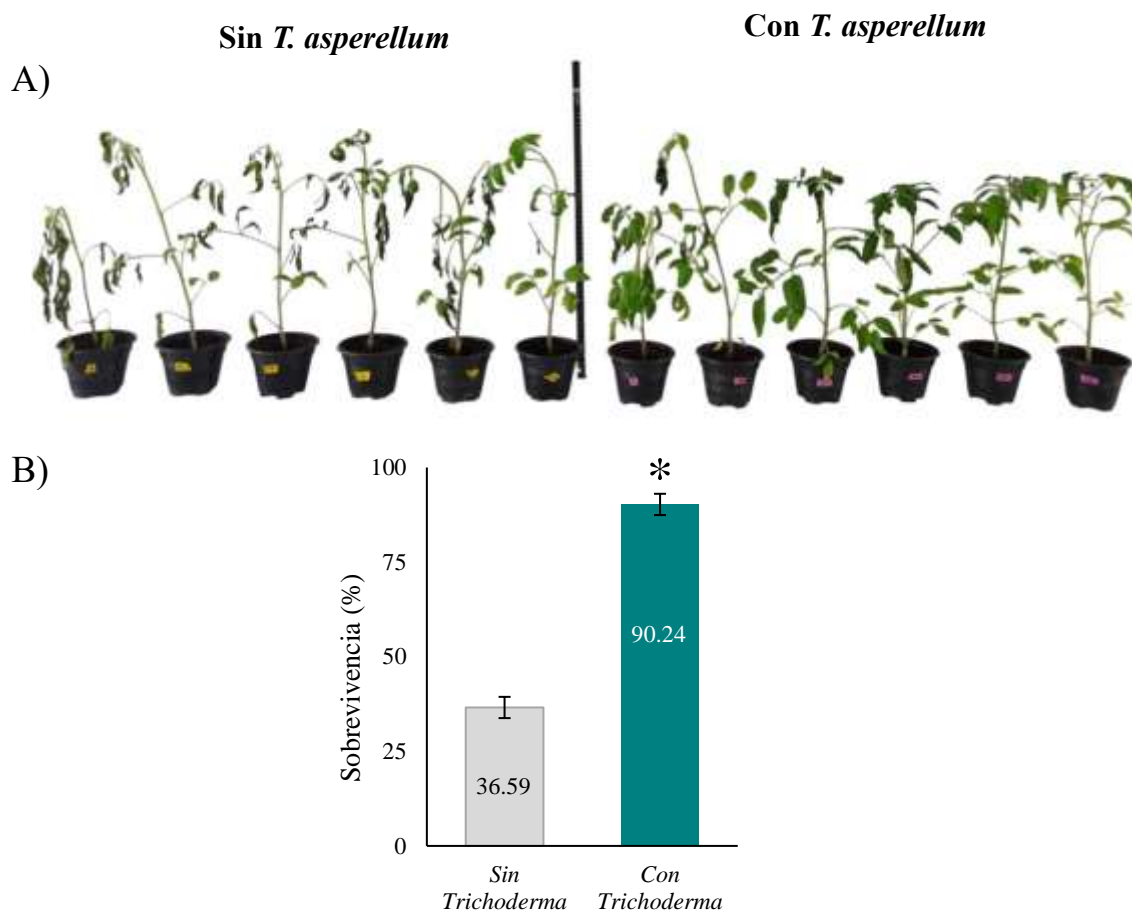


Figura 4. Efecto de la inoculación con *T. asperellum* en la sobrevivencia de plantas de jitomate ante estrés por frío.

A) Comparativa fenológica de plantas de jitomate con y sin *T. asperellum* tras estrés con 4 °C. Fotografía capturada una semana después del retorno de las plantas a invernadero y B) Sobrevivencia de plantas de jitomate calculó tras una semana de su retorno a invernadero, 7 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa en prueba t- student, $p < 0.05$.

Evaluación de parámetros bioquímicos en plantas de jitomate expuestas a estrés por frío

8.3.1. Detección histoquímica de H₂O₂ como indicador de estrés oxidativo

La producción de H₂O₂ en las hojas de las plantas de jitomate sometidas a los diferentes tratamientos fue evaluada mediante la tinción histoquímica con DAB. En la Figura 5 se muestran hojas representativas de plantas de jitomate sin y con *T. asperellum*, a través del tiempo de exposición a 4 °C o en condiciones de invernadero. La tinción reveló que las plantas sin *T. asperellum* presentaron un incremento gradual e intenso de la pigmentación con DAB. En contraste, las hojas de plantas con *T. asperellum* mostraron una menor pigmentación durante todo el periodo evaluado, indicando una menor presencia del H₂O₂ en el tejido foliar.

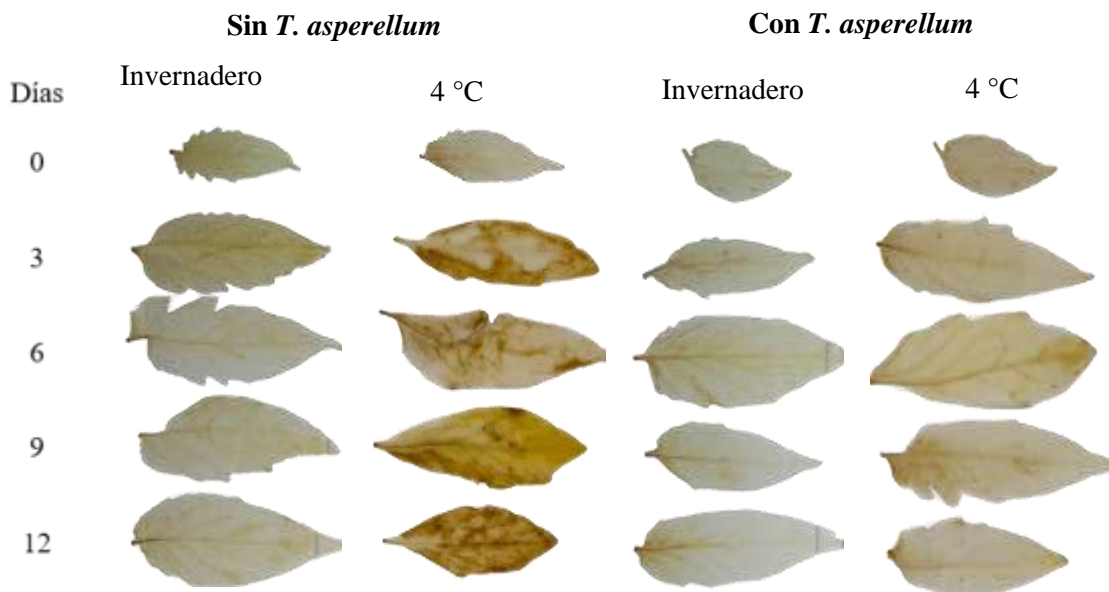


Figura 5. Detección histoquímica de H₂O₂ con tinción DAB. Fotografía representativa de hojas de jitomate con y sin *T. asperellum* en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.

8.3.2. Actividad de la enzima catalasa

Para la cuantificación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) se partió de extracto proteico previamente obtenido de las plantas con y sin *T. asperellum* en condiciones de invernadero y bajo estrés por frío (4 °C), durante los días 0, 3, 6, 9 y 12 días de los diferentes tratamientos. En la Figura 6 se muestran los resultados de la actividad de la enzima CAT, en el que se puede identificar que en las plantas con y sin *T. asperellum* en invernadero la actividad de la CAT permaneció con valores mínimos al encontrarse estas plantas en condiciones óptimas de crecimiento. Por otro lado, las plantas sin *T. asperellum* que se encontraban en estrés por frío presentaron la mayor actividad CAT a partir del día 3 hasta el día 12 del estrés por frío, mientras que las plantas con *T. asperellum* bajo la misma condición

estresante registraron valores de actividad de la CAT semejantes a sus respectivos controles durante todos los días evaluados.

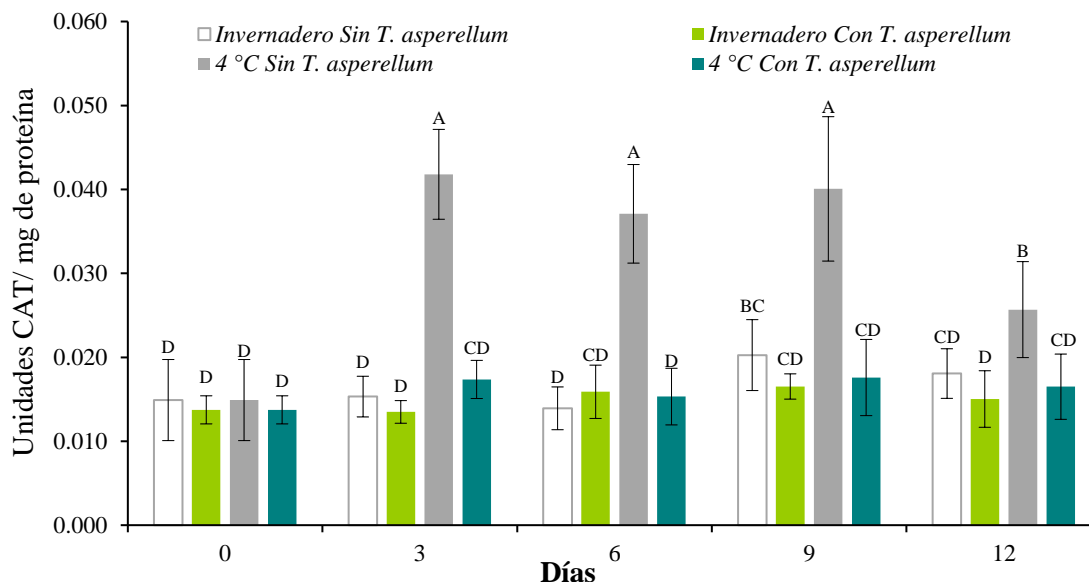


Figura 6. Actividad de la catalasa en hojas de jitomate con y sin *T. asperellum* en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.

Cada columna representa el promedio con desviación estándar, 2 experimentos independientes muestras por triplicado. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

8.3.3. Determinación de prolina

Para determinar la acumulación de prolina en las hojas de plantas de jitomate con y sin *T. asperellum* se realizó una reacción colorimétrica de los extractos proteicos con ninhidrina para posteriormente cuantificar en espectrofotómetro. Como se observa en la Figura 7, el contenido de prolina se mantuvo constante (115.9 mg/g de peso fresco) en plantas sin *T. asperellum* bajo condiciones de invernadero, mientras que durante el estrés a 4 °C el contenido incrementó 1.67 veces respecto a su control a partir del día 6. Respecto a las plantas inoculadas, el contenido de prolina incrementó tanto en condiciones de invernadero (220.81 mg/g de peso fresco) como bajo el estrés a 4 °C (287.91 mg/g de peso fresco).

8.3.4. Cuantificación de azúcares totales

El contenido de azúcares totales se determinó mediante el método colorimétrico con el reactivo antrona y su cuantificación en espectrofotómetro (Fig. 8). El contenido de azúcares totales en plantas sin *T. asperellum* se mantuvo en una concentración promedio de 65.7 mg/g de peso seco en los días evaluados sin diferencias significativas entre plantas en invernadero o retadas a 4 °C. En contraste, en las plantas con *T. asperellum* se identificó un incremento significativo de la concentración de azúcares totales alcanzando valores promedio de 83.24

y 89.71 mg/g de peso seco, en invernadero y a 4 °C respectivamente; es decir 1.26 veces y 1.34 veces más respecto sus pares sin inocular.

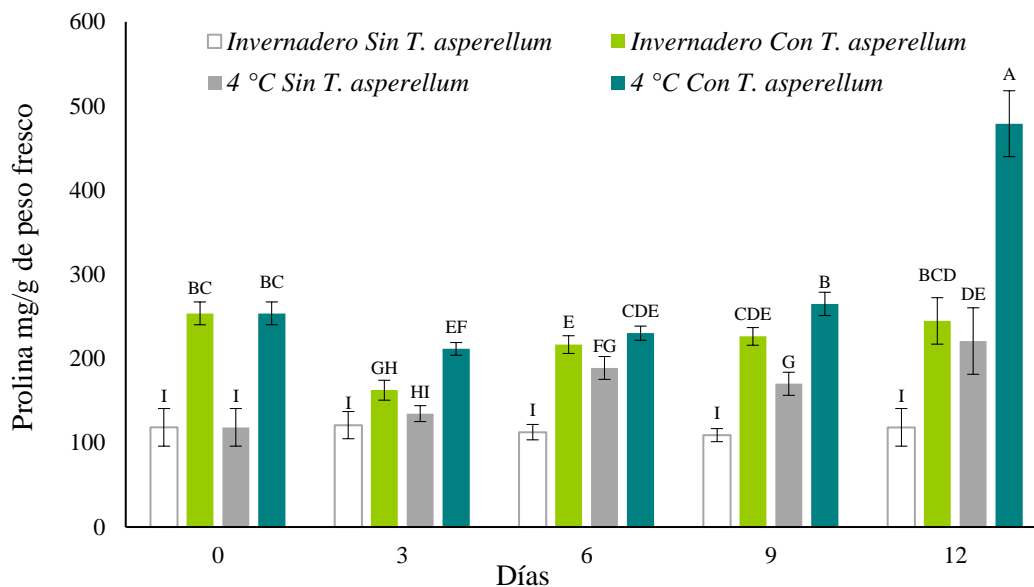


Figura 7. Contenido de prolina en hojas de jitomate con y sin *T. asperellum* en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.

Cada columna representa el promedio con desviación estándar, 2 experimentos independientes muestras por triplicado. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

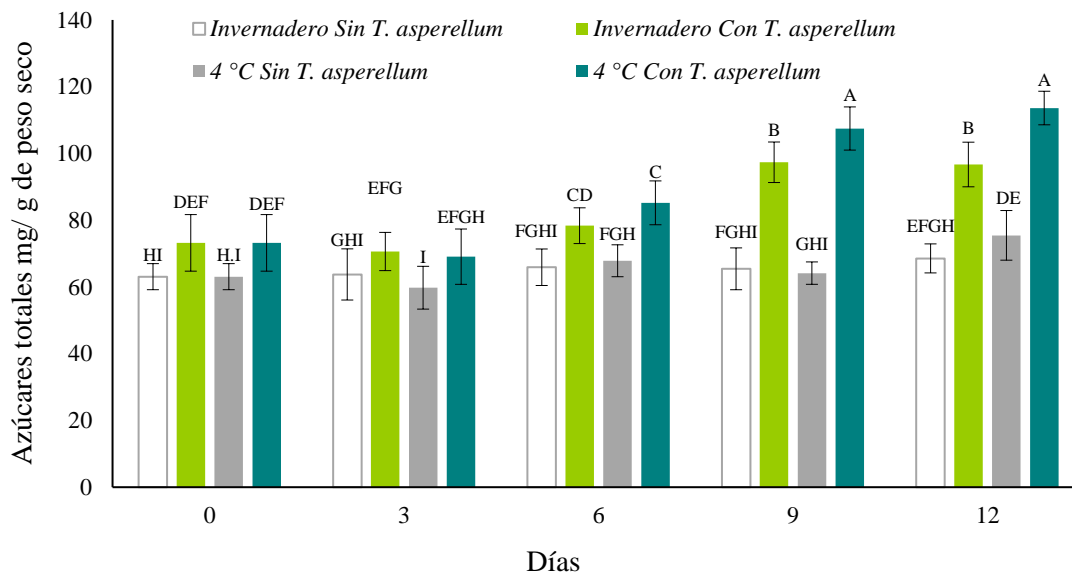


Figura 8. Azúcares totales en hojas de jitomate con y sin *T. asperellum* en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.

Cada columna representa el promedio con desviación estándar, 2 experimentos independientes muestras por triplicado. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

8.4. Evaluación de parámetros fisiológicos en plantas de jitomate inoculadas con *T. asperellum* expuestas a estrés por frío

8.4.1. Densidad e índice estomático

Con el propósito de evaluar el efecto del estrés por frío y la inoculación con *T. asperellum* sobre la densidad e índice estomático, así como en la morfometría de los estomas se realizaron improntas del envés de las hojas de plantas de jitomate con y sin *T. asperellum* en condiciones óptimas de crecimiento y durante el estrés por frío (4 °C) a partir del día 0, 3, 6 y 9 del experimento. En la Figura 9 se visualizan microfotografías representativas de cada uno de los tratamientos evaluados.

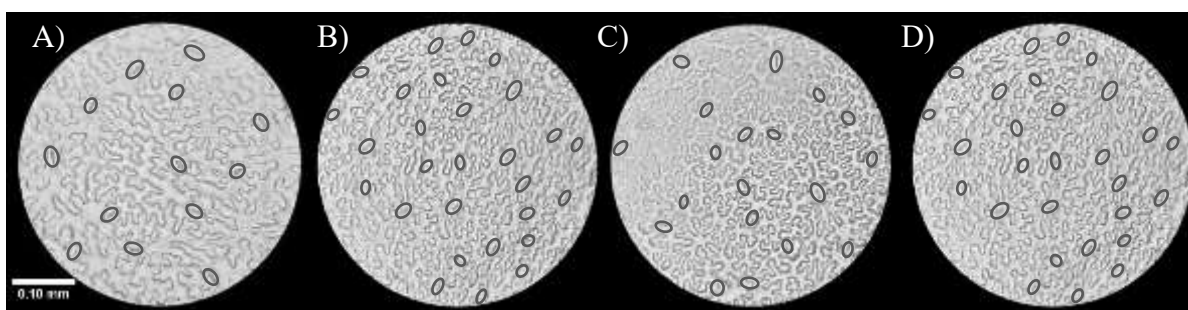


Figura 9. Microfotografías de improntas del envés de hojas de jitomate. A) Sin *T. asperellum* en invernadero, B) Sin *T. asperellum* a 4 °C, C) Con *T. asperellum* en invernadero y D) Con *T. asperellum* a 4 °C. Las microfotografías se capturaron al día 9 de cada tratamiento. Microscopio óptico a 40x. Barra 0.10 mm

La densidad estomática se calculó de acuerdo con la fórmula 7. En la Figura 10 se observa la variación de este parámetro en las hojas de jitomate en las diferentes condiciones evaluadas. Bajo la condición en invernadero sin *T. asperellum* la densidad incrementó gradualmente en los días evaluados manteniéndose en un rango entre 65 a 96 estomas/mm², mientras que con *T. asperellum* en invernadero varió en un rango de 80 hasta 109 estomas/mm². El estrés por frío incrementó la densidad estomática, siendo mayor este efecto en las plantas con *T. asperellum*.

El índice estomático se calculó con la fórmula 8 y se expresó en porcentaje. En la Figura 11 se puede identificar que el índice estomático de las hojas de jitomate sin *T. asperellum* en condición de invernadero permaneció en un rango promedio de 35.87% con valores semejantes a sus pares en estrés a 4 °C, a excepción del último día evaluado donde en este último grupo se identificó un incremento del 14% respecto al promedio de los días evaluados en invernadero. En cuanto a las plantas con *T. asperellum*, éstas mostraron el mayor índice

estomático tanto en invernadero como a 4 °C, con valores promedio de 40.46%. El mayor incremento se observó a 4 °C (12 días).

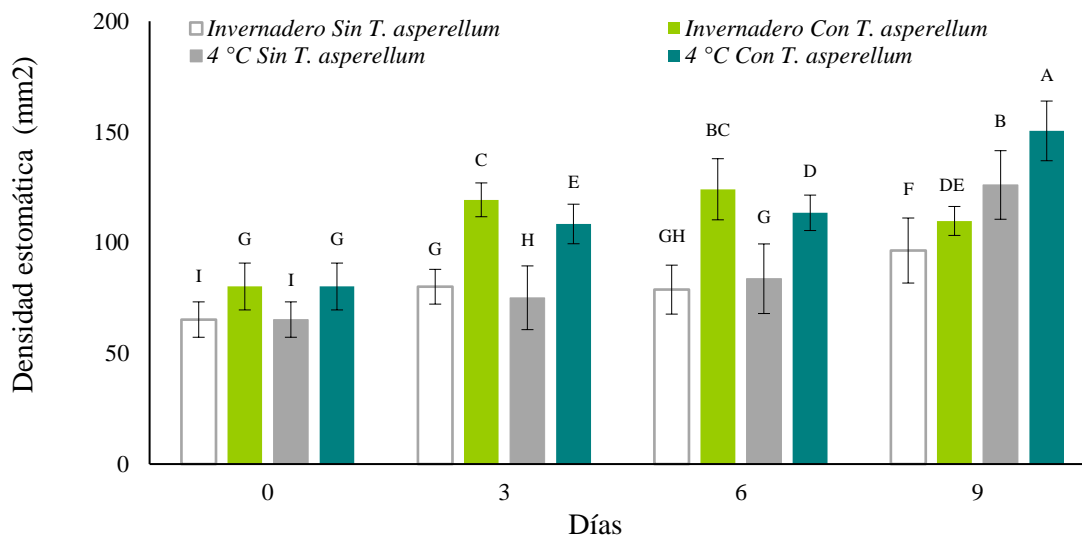


Figura 10. Densidad estomática de hojas de jitomate con y sin *T. asperellum* en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.

Cada columna representa el promedio con desviación estándar, 4 experimentos independientes con 30 observaciones por cada condición. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

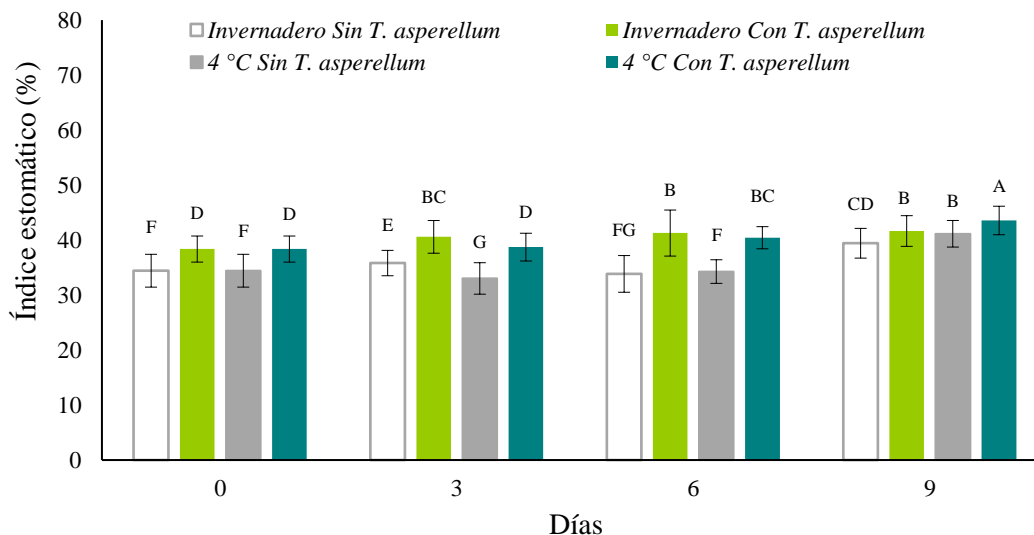


Figura 11. Índice estomático de hojas de jitomate con y sin *T. asperellum* en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.

Cada columna representa el promedio con desviación estándar, 4 experimentos independientes con 30 observaciones por cada condición. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

8.4.2. Morfometría de los estomas

Las dimensiones físicas de los estomas son características elementales para una función estomática óptima, de manera que en este trabajo se consideró la evaluación de la longitud, ancho y área de los estomas de las plantas de jitomate en los diferentes tratamientos. En la Figura 11A,B,C se muestra que las plantas sin inocular tuvieron los estomas con mayores dimensiones (longitud, ancho y área) que con respecto al de los estomas de plantas inoculadas. Durante el estrés por frío, los estomas de las plantas sin *T. asperellum* fueron los de mayores dimensiones en tanto que las plantas con *T. asperellum* conservaron sus dimensiones en ambas temperaturas durante todo el periodo evaluado.

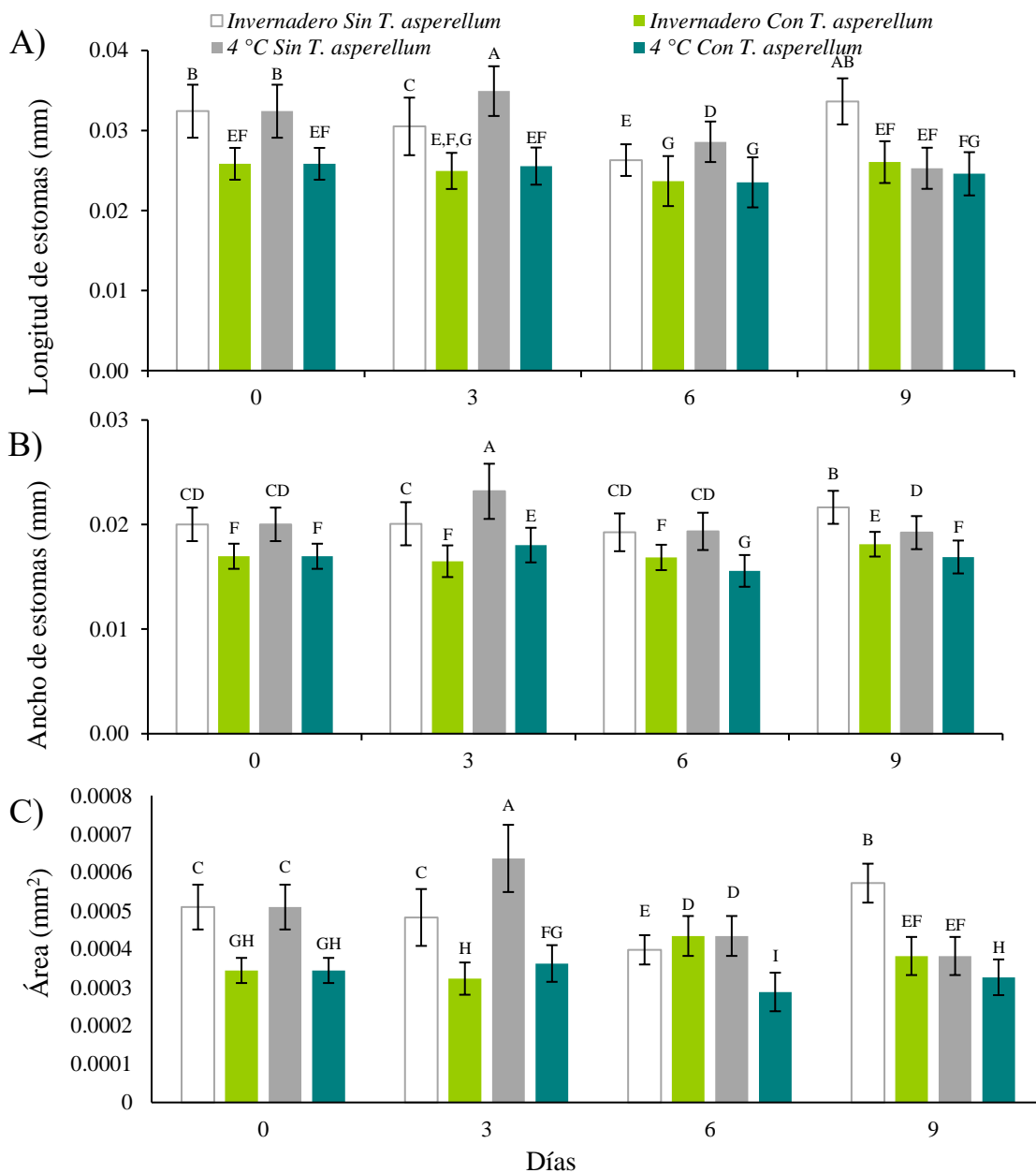


Figura 12. Parámetros morfométricos de estomas de hojas de jitomate con y sin *T. asperellum* en invernadero y en estrés por frío con 4 °C.

A) Longitud, B) Ancho, C) Área de los estomas. Cada columna representa el promedio con desviación estándar, 4 experimentos independientes con 100 observaciones por cada condición. Diferentes letras denotan diferencia significativa en prueba Tukey, $p < 0.05$.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1. Evaluación de viabilidad de *T. asperellum* ante el estrés por frío

El descenso de las temperaturas es un fenómeno climático que no solo limita el desarrollo de plantas sensibles al frío, si no también sobre la actividad de la población microbiana de suelos (Maurya et al., 2022; Schneckner et al., 2023). En este sentido, el presente estudio incluyó la evaluación de la viabilidad de *T. asperellum* bajo condiciones de estrés por frío. La mayoría de las especies de *Trichoderma* son mesófilas, en consecuencia, el descenso de temperatura por debajo de los 15 °C afecta la velocidad de asimilación de nutrientes y actividad enzimática, especialmente en medios de crecimiento artificiales como el PDA; por ejemplo, la actividad enzimática de amilasas de *T. gamsii* se reduce (Carro-Huerga et al., 2021).

De acuerdo a los resultados del presente trabajo, se detectó que el crecimiento *in vitro* del hongo a bajas temperaturas se comprometió; sin embargo, cuando las cajas de Petri con el hongo inoculado se retornaban a 30 °C, el crecimiento radial se restauraba, como previamente se reportó para *T. gamsii* (Carro-Huerga et al., 2021).

Con respecto a la viabilidad de *T. asperellum in situ* (en el sustrato de crecimiento de las plantas inoculadas), se encontró que la cantidad de inóculo inicial no variaba en ambas condiciones térmicas. La sobrevivencia y reproducción de *T. asperellum* en el sustrato de plantas bajo estrés térmico podría relacionarse con la formación de clamidosporas, ya que se ha reportado que estas estructuras representan un mecanismo de protección frente a situaciones adversas (Cao et al., 2023). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la asociación de *Arabidospis thaliana* con *T. atroviride* y *T. virens* promueve la producción de biomasa de las plántulas a 12 °C, por efecto de los compuestos orgánicos volátiles producidos por los hongos, aun cuando las temperaturas son bajas (González-Pérez et al., 2018).

9.2. Efecto de la bioinoculación de plantas de jitomate con *T. asperellum* en la disminución de los daños causados por frío

El estrés por frío afecta diversos parámetros de crecimiento en plantas sensibles al estrés, los cuales pueden evaluarse mediante indicadores fenotípicos, fisiológicos y bioquímicos. En este trabajo se evaluó la disminución del daño causado por el estrés en respuesta a la inoculación de plantas de jitomate con *T. asperellum*. Los resultados demostraron que la

inoculación con *T. asperellum* incrementó significativamente la sobrevivencia de las plantas de jitomate expuestas a bajas temperaturas y disminuyendo sus índices de severidad de daño. Estos resultados reforzaron trabajos previos de nuestro grupo de investigación, que demostraron poca afectación en parámetros agronómicos y fuga de electrolitos en plantas de jitomate inoculadas con *T. asperellum* frente al estrés por frío (Cornejo-Ríos et al., 2021). La interacción planta-*Trichoderma* spp. ha sido asociada con una mejora en la absorción de nutrientes y el mantenimiento del estado hídrico de las plantas, este efecto es importante bajo condiciones de estrés por frío ya que durante este tipo de estrés se reduce la transpiración y se limita la traslocación de nutrientes y transporte de agua. La inoculación con *Trichoderma* spp. se caracteriza por favorecer la eficiencia del sistema radicular, reflejándose en una regulación más efectiva del uso del agua. Este efecto podría contribuir a la preservación de la funcionabilidad celular y a una mayor tolerancia ante el estrés (Contreras-Cornejo et al., 2016; Devi et al., 2023; Mahoma et al., 2022).

9.3. Evaluación del efecto de *T. asperellum* sobre parámetros bioquímicos de plantas de jitomate expuestas a estrés por frío

9.3.1. Acumulación de H₂O₂

Entre las respuestas tempranas asociadas con la percepción del estrés abiótico en plantas, se encuentra la producción de ROS. Entre ellas el H₂O₂ desempeña una función dual en la célula vegetal, ya que puede actuar como molécula señalizadora durante los procesos de respuesta al estrés o convertirse en una molécula promotora del estrés oxidativo (Saxena et al., 2016; Hasanuzzaman et al., 2020).

El presente trabajo reveló que el estrés por frío indujo una elevada acumulación de esta ROS en las hojas de plantas de jitomate sin *T. asperellum*, mientras que las plantas inoculadas con *T. asperellum*, mostraron una mínima acumulación del H₂O₂, sugiriendo una regulación más eficiente del estado redox celular que evita su sobreacumulación. Los resultados de este estudio son consistentes con reportes previos, que señalan una reducción en la acumulación de H₂O₂ en plantas previamente inoculadas con especies de *Trichoderma* y sometidas a diferentes tipos de estrés. Por ejemplo, las ROS disminuyen en plantas de jitomate inoculadas con *T. koningi* (Tripathi et al., 2021) o *T. asperellum* y estresadas con calor o *Fusarium oxysporum*, respectivamente (Herrera-Téllez et al., 2019).

9.3.2. Actividad de la catalasa

El conjunto de enzimas antioxidantes presentes en las células vegetales permite neutralizar a las diversas ROS que se producen durante el estallido oxidativo. Entre ellas, la enzima CAT regula el contenido del H₂O₂, catalizando su descomposición en agua y oxígeno (Mhamdi et al., 2010; Palma et al., 2020). En el presente estudio, las plantas de jitomate sin *T.*

asperellum bajo estrés por frío mostraron un incremento en la actividad de la CAT, lo cual coincide con los altos niveles de ROS detectados por tinción histoquímica. No obstante, por el bajo porcentaje de sobrevivencia observada en las plantas sin inocular y sometidas a estrés térmico (36.5%), se sugiere que la actividad de la CAT no fue suficiente para contrarrestar el daño celular provocado por la acumulación de H₂O₂. Se ha reportado que, en condiciones estresantes, la CAT puede sufrir modificaciones post-traduccionales como la carbonilación, que afecta su estabilidad y estructura. Asimismo, se ha postulado que los grupos carbonilo pueden provenir de productos liberados tras la peroxidación lipídica celular (Lin, 2018; Jiménez et al., 2025)

Por el contrario, las plantas inoculadas con *Trichoderma* y expuestas al estrés por frío presentaron una menor actividad de la CAT, pero un porcentaje de sobrevivencia significativamente mayor (90.2%). Este resultado sugiere que la inoculación con *T. asperellum* indujo una respuesta fisiológica, específicamente la Respuesta Sistémica Inducida por *Trichoderma* (TIRS por sus siglas en inglés: *Trichoderma induced systemic resistance*), que pudo haber evitado la explosión oxidativa frente al estrés por frío, no requiriéndose una actividad fuerte de la CAT (Morán-Diez et al., 2021; Mandal et al., 2023; Pacheco-Trejo et al., 2022).

9.2.3. Contenido de prolina

La regularización del balance redox en las células vegetales está fuertemente asociada de la acumulación de la prolina. Se ha documentado que este aminoácido cumple diferentes funciones relacionadas con las respuestas adaptativas al estrés abiótico, principalmente el mantenimiento del potencial osmótico, estabilización de proteínas y membranas, así como la provisión de fuente de carbono y nitrógeno aprovechable tras un episodio de estrés (Hosseinfard et al., 2022; Raza et al., 2023).

En el presente estudio se registró un mayor contenido de prolina en las plantas inoculadas con *T. asperellum* en comparación con las plantas no inoculadas, tanto en condiciones óptimas de crecimiento como en la condición estresante, indicando un efecto positivo de *T. asperellum* en la mitigación del daño causado por el estrés por frío a través del contenido de este aminoácido.

Existe evidencia sobre algunas especies de *Trichoderma* que sintetizan prolina para protegerse en condiciones de estrés abiótico y durante el micoparasitismo (Hirpara & Gajera, 2023), sin embargo, al momento no hay evidencia que indique una transferencia directa de prolina fúngica hacia la planta. No obstante, diversos estudios han señalado que la mayor acumulación de este aminoácido en las plantas inoculadas con *Trichoderma* puede derivar de una reprogramación metabólica inducida por hormonas fúngicas, incluyendo análogos de

AIA, GA, citocininas, ET y ABA, durante la interacción simbiótica (Alfiky et al., 2021; Mandal et al., 2023; dos Santos et al., 2025).

Anteriormente se ha reportado que *Trichoderma* incrementa el contenido de prolina para mitigar el daño causado por la salinidad en plántulas de calabaza (Soliman et al., 2020); sequía en plantas de arroz (Yadav et al., 2025); frío en plantas de jitomate (Ghorbanpour et al., 2018) y plántulas de maíz (Afrouz et al., 2023).

9.2.4. Cuantificación de azúcares totales

Las plantas no solo utilizan los azúcares derivados de la fotosíntesis como fuente de carbono, sino que están estrechamente relacionados con los procesos de señalización que ajustan el estado energético de las células. Por lo tanto, la biosíntesis de azúcares, su concentración, transporte y degradación responden tanto a la demanda de los órganos: hojas, raíces y frutos, como a las condiciones ambientales en la que se desarrollan las plantas con el objetivo de ajustar su metabolismo (Lastdrager et al., 2014; Afzal et al., 2021).

La aplicación de azúcares como la trehalosa en plantas de jitomate expuestas a 15 °C como temperatura limitante de crecimiento, produjo una respuesta favorable, principalmente reflejado en una menor acumulación de H₂O₂ y fuga de electrolitos (Liu et al., 2020).

En este trabajo se registró una elevada concentración de azúcares totales en las plantas previamente inoculadas con el hongo *T. asperellum*, en comparación con las plantas sin inocular.

9.3. Evaluación de parámetros fisiológicos en plantas de jitomate expuestas a estrés por frío

9.3.1. Parámetros estomáticos

Actualmente no se cuenta con referencias que relacionen la asociación de *Trichoderma* sobre la densidad e índice estomático de plantas inoculadas. En el presente trabajo, se demostró que las plantas sin inocular presentaron parámetros estomáticos similares a lo reportado por Farber et al., (2016). Por otro lado, los resultados revelaron que la sola inoculación de las plantas con *T. asperellum* modificó los parámetros estomáticos de plantas, incrementándose la densidad e índice estomático y disminuyendo el tamaño de los estomas, efectos que se vieron potenciados ante el estrés sugiriendo una alteración en el equilibrio hormonal en las plantas (auxinas, giberelinas, ácido abscísico, ácido salicílico, ácido indolacético y citoquininas) que favorecen los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Ramirez-Valdespino et al., 2019; Illescas et al., 2021; Pacheco-Trejo et al., 2022).

En este sentido, las hormonas vegetales como las auxinas están involucradas en los patrones estomáticos, específicamente en las primeras etapas de formación en la matriz celular epidérmica, en donde a partir de una célula madre meristemoide, a través de repetidas

divisiones asimétricas, se produce una célula protectora, la cual tras una única división simétrica formará a las células guarda emparejadas que rodearan el poro estomático. La ontogenia de los estomas es distintiva entre especies, sin embargo, algunos factores de transcripción como el bHLH (basic hélix-loop-helix) se han identificado como una transición compartida entre algunas plantas superiores (Xingyun & Torri, 2018; Wei et al., 2021).

Por otro lado, se ha descubierto que tanto el ácido abscísico como el ácido indolacético regulan el desarrollo estomático, generalmente manteniéndolo con bajas densidades; aunque este efecto varía entre especies y por estímulos ambientales; cuando ambas señales son favorables los estomas se distribuyen de manera uniforme para maximizar el intercambio eficiente de gases y regular la transpiración para minimizar la pérdida de agua (Wei et al., 2021; Pridgeon et al., 2021). Sin embargo, situaciones de estrés abiótico pueden alterar la distribución estomática, Rosouli et al. (2021) reportaron una mayor tolerancia a salinidad en plantas de *Beta vulgaris*, lo cual se atribuyó a una mayor apertura y cierre estomático de las plantas que incrementaron su densidad estomática.

10. CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que *T. asperellum* mantiene su viabilidad en el sustrato bajo estrés por frío, lo que permite su interacción funcional con las plantas de jitomate bajo esta condición estresante. La inoculación con *T. asperellum* redujo significativamente la severidad del daño, incrementó la sobrevivencia de las plantas y favoreció una respuesta fisiológica más eficiente respecto a las plantas controles. Este efecto protector se asoció con una menor acumulación de H₂O₂, lo que indica una activación de mecanismos de defensa ante el estrés por frío entre ellos una regulación más eficiente del sistema antioxidante y una mayor acumulación de compuestos osmoprotectores como prolina y azúcares totales. También, *T. asperellum* moduló las características estomáticas de las hojas, promoviendo una mayor funcionabilidad estomática durante el estrés por frío, mejorando posiblemente el intercambio de gases y el uso eficiente del agua, favoreciendo procesos como la fotosíntesis. En conjunto, estos hallazgos evidencian el papel de *T. asperellum* como agente biológico con alto potencial de aplicación en sistemas agrícolas expuestos a bajas temperaturas.

11. PERSPECTIVAS

Los resultados de esta investigación revelan que la inoculación con *T. asperellum* mitiga los efectos negativos del estrés por frío en plantas de *S. lycopersicum*. Dado que se observaron cambios importantes en la morfología y distribución estomática en las plantas previamente inoculadas y que reflejaron la mayor sobrevivencia ante el estrés por frío, sería fructífero valorar el efecto de *T. asperellum* sobre los tejidos vasculares de las plantas: un estudio histológico de tallo y raíz permitiría determinar si el hongo promueve adaptaciones estructurales como el engrosamiento de paredes celulares o el incremento del número de vasos xilemáticos que favorezcan el transporte hídrico bajo el estrés. Asimismo, se propone explorar las bases moleculares de la tolerancia térmica inducida por *T. asperellum* a través de la detección de genes marcadores específicos, con el objetivo de discernir si parte de la protección reportada en este estudio esta mediada por rutas de respuesta a fitohormonas o por la expresión de proteínas de respuesta al estrés, aportando así una comprensión integral que complemente los hallazgos fisiológicos y bioquímicos derivados de la presente investigación.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, P., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., John, R., Egamberdieva, D., & Guzel, S. (2015). Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L) through antioxidative defense system. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 868. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00868>
- Andrade-Linares, D. R., Veresoglou, S. D., & Rillig, M. C. (2016). Temperature priming and memory in soil filamentous fungi. *Fungal Ecology*, *21*, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.02.002>
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, *12*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/12071496>
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, *141*(2), 391-396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
- Austin, J. R., II, Frost, E., Vidi, P.-A., Kessler, F., & Staehelin, L. A. (2006). Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell*, *18*(7), 1693-1703. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039859>
- Beck, H. E., Zimmermann, N. E., McVicar, T. R., Vergopolan, N., Berg, A., & Wood, E. F. (2018). Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Scientific Data*, *5*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>
- Bieto, J. A., & Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, *186*, 343-355. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86128-i](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-i)
- Camarena-Gutiérrez, G. (2006). Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*.
- Carro-Huerga, G., Mayo-Prieto, S., Rodríguez-González, Á., Álvarez-García, S., Gutiérrez, S., & Casquero, P. A. (2021). The influence of temperature on the growth, sporulation, colonization, and survival of *Trichoderma* spp. in grapevine pruning wounds. *Agronomy*, *11*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091771>
- Cartaya, O. (2001). *Flavonoides: características químicas y aplicaciones*.
- Chin, D.-C., Senthil Kumar, R., Suen, C.-S., Chien, C.-Y., Hwang, M.-J., Hsu, C.-H., Xuhan, X., Lai, Z. X., & Yeh, K.-W. (2019). Plant cytosolic ascorbate peroxidase with dual catalytic activity modulates abiotic stress tolerances. *iScience*, *16*, 31-49. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.014>
- Chitarra, W., Pagliarani, C., Maserti, B., Lumini, E., Siciliano, I., Cascone, P., Schubert, A., Gambino, G., Balestrini, R., & Guerrieri, E. (2016). Insights on the impact of arbuscular

- mycorrhizal symbiosis on tomato tolerance to water stress. *Plant Physiology*, *171*(2), 1009-1023. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00307>
- Cornejo-Ríos, K., Osorno-Suárez, M. del P., Hernández-León, S., Reyes-Santamaría, M. I., Juárez-Díaz, J. A., Pérez-España, V. H., Peláez-Acero, A., Madariaga-Navarrete, A., & Saucedo-García, M. (2021). Impact of *Trichoderma asperellum* on chilling and drought stress in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Horticulturae*, *7*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100385>
- Corpas, F. J., González-Gordo, S., & Palma, J. M. (2020). Plant peroxisomes: a factory of reactive species. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00853>
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, *11*(1), 163. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>
- Czégény, G., & Rácz, A. (2023). Phenolic peroxidases: Dull generalists or purposeful specialists in stress responses? *Journal of Plant Physiology*, *280*, 153884. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153884>
- del Río, L. A., & López-Huertas, E. (2016). ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant and Cell Physiology*, *57*(7), 1364-1376. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw076>
- Delgado-Jarana, J., Moreno-Mateos, M. Á., & Benítez, T. (2003). Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of *gtt1*. *Eukaryotic Cell*, *2*(4), 708-717. <https://doi.org/10.1128/EC.2.4.708-717.2003>
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, *109*, 212-228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- Ding, S., Huang, C.-L., Sheng, H.-M., Song, C.-L., Li, Y.-B., & An, L.-Z. (2011). Effect of inoculation with the endophyte *Clavibacter* sp. Strain *Enf12* on chilling tolerance in *Chorisporea bungeana*. *Physiologia Plantarum*, *141*(2), 141-151. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01428.x>
- Dmitrieva, V. A., Tyutereva, E. V., & Voitsekhovskaja, O. V. (2020). Singlet oxygen in plants: generation, detection, and signaling roles. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms21093237>
- Drobek, M., Fraç, M., & Cybulska, J. (2019). Plant biostimulants: importance of the quality and yield of horticultural crops and the improvement of plant tolerance to abiotic stress—A review. *Agronomy*, *9*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060335>
- Estrada Salazar, G. I., & Ramírez Galeano, M. C. (2019). *Micología general*. Centro Editorial Universidad Católica de Manizales. <https://repositorio.ucm.edu.co/jspui/handle/10839/2654>
- Eugeni, Piller, L., Glauser, G., Kessler, F., & Besagni, C. (2014). Role of plastoglobules in metabolite repair in the tocopherol redox cycle. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 298. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00298>

- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, *17*(7), 1866-1875. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>
- García de Miranda, Enriqueta (2004). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen: para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. México. UNAM, Instituto de Geografía.
- Garg, N., & Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, *143*(1), 81-96. <https://doi.org/10.1080/11263500802633626>
- Ghorbanpour, A., Salimi, A., Ghanbary, M. A. T., Pirdashti, H., & Dehestani, A. (2018). The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Scientia Horticulturae*, *230*, 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.028>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Guo, X., Liu, D., & Chong, K. (2018). Cold signaling in plants: insights into mechanisms and regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, *60*(9), 745-756. <https://doi.org/10.1111/jipb.12706>
- Habibi, G. (2014). Chapter 19—Hydrogen peroxide (H₂O₂) generation, scavenging and signaling in plants. En P. Ahmad (Ed.), *Oxidative Damage to Plants* (pp. 557-584). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00019-8>
- Hajihashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J. M. C., Djalovic, I., & Siddique, K. H. M. (2018). Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01430>
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, *141*(2), 312-322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I., & Fujita, M. (2017). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *23*(2), 249-268. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0422-2>
- Hasanuzzaman, M., Zhou, M., & Shabala, S. (2023). How does stomatal density and residual transpiration contribute to osmotic stress tolerance? *Plants*, *12*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/plants12030494>
- Hernández, J. A., Barba-Espín, G., & Diaz-Vivancos, P. (2017). Glutathione-mediated biotic stress tolerance in plants. En M. A. Hossain, M. G. Mostofa, P. Diaz-Vivancos, D. J. Burritt, M. Fujita, & L.-S. P. Tran (Eds.), *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance* (pp. 309-329). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66682-2_14

- Herrera-Télez, V. I., Cruz-Olmedo, A. K., Plasencia, J., Gavilanes-Ruíz, M., Arce-Cervantes, O., Hernández-León, S., & 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 2007. <https://doi.org/10.3390/ijms20082007>
- Hidangmayum, A., & Dwivedi, P. (2018). Plant responses to *Trichoderma* spp. and their tolerance to abiotic stresses: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 758-766.
- Horemans, N., Foyer, C. H., & Asard, H. (2000). Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science*, 5(6), 263-267. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01649-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01649-6)
- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzländer, M., Belt, K., & Millar, A. H. (2016). The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants1[OPEN]. *Plant Physiology*, 171(3), 1551-1559. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00166>
- Huang, Z.-A., Zhao, T., Fan, H.-J., Wang, N., Zheng, S.-S., & Ling, H.-Q. (2012). The upregulation of *NtAN2* expression at low temperature is required for anthocyanin accumulation in juvenile leaves of Lc-transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 39(3), 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.01.007>
- Jiménez-Quesada, M. J., Traverso, J. Á., & Alché, J. de D. (2016). NADPH oxidase-dependent superoxide production in plant reproductive tissues. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00359>
- Kao, Y.-T., Gonzalez, K. L., & Bartel, B. (2018). Peroxisome function, biogenesis, and dynamics in plants1[OPEN]. *Plant Physiology*, 176(1), 162-177. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01050>
- Kliebenstein, D. J., Monde, R. A., & Last, R. L. (1998). Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*, 118(2), 637-650. <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.637>
- Kramarenko, G. G., Hummel, S. G., Martin, S. M., & Buettner, G. R. (2006). Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. *Photochemistry and photobiology*, 82(6), 1634-1637. <https://doi.org/10.1562/2006-01-12-RN-774>
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., & Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technol. Biotechnol.* 41 (1) 37–42
- Kunert, K. J; Foyer, C. H. (2023). Chapter three - the ascorbate/glutathione cycle, Editor(s): Ron Mittler, Frank Van Breusegem, *Advances in Botanical Research, Academic Press*, Volume 105, ISBN 9780323913744, <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2022.11.004>.
- Latgé, J.-P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 66(2), 279-290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>
- Lazzarotto, F., Turchetto-Zolet, A. C., & Margis-Pinheiro, M. (2015). Revisiting the non-animal peroxidase superfamily. *Trends in Plant Science*, 20(12), 807-813. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.005>

- Li, S., Liu, S., Zhang, Q., Cui, M., Zhao, M., Li, N., Wang, S., Wu, R., Zhang, L., Cao, Y., & Wang, L. (2022). The interaction of ABA and ROS in plant growth and stress resistances. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1050132. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1050132>
- Mahmood, Q., Ahmad, R., Kwak, S.-S., Rashid, A., & Anjum, N. A. (2010). Ascorbate and glutathione: protectors of plants in oxidative stress. En N. A. Anjum, M.-T. Chan, & S. Umar (Eds.), *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants* (pp. 209-229). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9404-9_7
- Mansour, E., Mahgoub, H. A. M., Mahgoub, S. A., El-Sobky, E.-S. E. A., Abdul-Hamid, M. I., Kamara, M. M., AbuQamar, S. F., El-Tarabily, K. A., & Desoky, E.-S. M. (2021). Enhancement of drought tolerance in diverse *Vicia faba* cultivars by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria under newly reclaimed soil conditions. *Scientific Reports*, *11*(1), 24142. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02847-2>
- Mathews, C. K. ; et al. (2002). *Bioquímica / Christopher K., Mathews ... [Et al.]* (3a ed.). Pearson.
- Matos-Trujillo, M., Díaz-Solares, M., Samaniego-Fernández, L. M., Cortegaza-Ávila, L., Pérez-Milian, J. R., Pellón-Guzmán, Y., Rufín-Hernández, Y., & Pérez-Pérez, J. (2017). Expresión de la enzima peroxidasa en plantas de *Saccharum* sp. híbrido inoculadas con *Xanthomonas albilineans* Ashby (Dowson). *Pastos y Forrajes*, *40*(3), 195-200.
- Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoeberichts, F. A., Mühlenbock, P., Brosché, M., Van Breusegem, F., & Kangasjärvi, J. (2016). Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*, *67*(13), 3831-3844. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw080>
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, *22*(1), 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, *417*(Pt 1), 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nadarajah, K. K. (2020). ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15), 5208. <https://doi.org/10.3390/ijms21155208>
- Nayyar, H., Bains, T. S., & Kumar, S. (2005). Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany*, *54*(3), 275-285. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.09.007>
- Nephali, L., Piater, L. A., Dubery, I. A., Patterson, V., Huyser, J., Burgess, K., & Tugizimana, F. (2020). Biostimulants for plant growth and mitigation of abiotic stresses: a metabolomics perspective. *Metabolites*, *10*(12), 505. <https://doi.org/10.3390/metabo10120505>
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, *35*(2), 454-484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>

- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, *06*(01). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
- Podgórska, A., Burian, M., & Szal, B. (2017). Extra-cellular but extra-ordinarily important for cells: apoplastic reactive oxygen species metabolism. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1353. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01353>
- Potocký, M., Jones, M. A., Bezvoda, R., Smirnoff, N., & Žárský, V. (2007). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *The New Phytologist*, *174*(4), 742-751. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02042.x>
- Rabiei, Z., Hosseini, S. J., Pirdashti, H., & Hazrati, S. (2020). Physiological and biochemical traits in coriander affected by plant growth-promoting rhizobacteria under salt stress. *Heliyon*, *6*(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05321>
- Reumann, S., & Bartel, B. (2016). Plant peroxisomes: Recent discoveries in functional complexity, organelle homeostasis, and morphological dynamics. *Current Opinion in Plant Biology*, *34*, 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.008>
- Rodríguez-Pérez, L. (2006). Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/33146>
- Scudeletti, D., Crusciol, C. A. C., Bossolani, J. W., Moretti, L. G., Momesso, L., Servaz Tubaña, B., de Castro, S. G. Q., De Oliveira, E. F., & Hungria, M. (2021). *Trichoderma asperellum* inoculation as a tool for attenuating drought stress in sugarcane. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 645542. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.645542>
- SEMARNAT. (2023). *Atlas digital geográfico*. http://gisviewer.semarnat.gob.mx/aplicaciones/Atlas2015/atm_climas.html
- Shapiguzov, A., Vainonen, J. P., Wrzaczek, M., & Kangasjärvi, J. (2012). ROS-talk – how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 292. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00292>
- Sharma, M., Idong, S., Sharma, R., & Singh, P. (2020). Isolation and evaluation of temperature tolerant *Trichoderma*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *9*(3), 1164-1171. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2020.903.136>
- Snyder, R., & Melo-Abreu, J. (2010). Protección contra las heladas: Fundamentos, práctica y economía / R. Snyder, J.P. de Melo-Abreu ; pról. de Peter Holmgren ; tr. por Josep M. Villar-Mir.
- Soydam Aydin, S., Büyük, I., & Aras, S. (2013). Relationships among lipid peroxidation, SOD enzyme activity, and SOD gene expression profile in *Lycopersicon esculentum* L. exposed to cold stress. *Genetics and Molecular Research: GMR*, *12*(3), 3220-3229. <https://doi.org/10.4238/2013.August.29.6>
- Sun, L. R., Zhao, Z. J., & Hao, F. S. (2019). NADPH oxidases, essential players of hormone signalling in plant development and response to stresses. *Plant Signaling & Behavior*, *14*(11), 1657343. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1657343>

- Suriani Ribeiro, M., Graciano de Paula, R., Raquel Voltan, A., de Castro, R. G., Carraro, C. B., José de Assis, L., Stecca Steindorff, A., Goldman, G. H., Silva, R. N., Ulhoa, C. J., & Neves Monteiro, V. (2019). Endo- β -1,3-glucanase (*GH16* Family) from *Trichoderma harzianum* participates in cell wall biogenesis but is not essential for antagonism against plant pathogens. *Biomolecules*, 9(12), 781. <https://doi.org/10.3390/biom9120781>
- Suzuki, N., & Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 45-51. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x>
- Treseder, K. K., & Lennon, J. T. (2015). Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 79(2), 243-262. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-15>
- Tripathi, R., Keswani, C., & Tewari, R. (2021). *Trichoderma Koningii* enhances tolerance against thermal stress by regulating ROS metabolism in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Plant Interactions*, 16(1), 116-125. <https://doi.org/10.1080/17429145.2021.1908634>
- Tripathy, B. C., & Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signalling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 7(12), 1621-1633. <https://doi.org/10.4161/psb.22455>
- Valdez Sepúlveda, L., González-Morales, S., & Benavides Mendoza, A. (2015). Ácido benzoico: biosíntesis, modificación y función en plantas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(7), 1667-1678.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal*, 16(16), 4806-4816. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4806>
- Xu, S., Li, Y., Hu, J., Guan, Y., Ma, W., Zheng, Y., & Zhu, S. (2010). Responses of antioxidant enzymes to chilling stress in tobacco seedlings. *Agricultural Sciences in China*, 9(11), 1594-1601. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60256-X](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60256-X)
- You, J., & Chan, Z. (2015). ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.01092>
- Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., & Juárez-Maldonado, A. (2021). Efecto de los ácidos fenólicos en el sistema antioxidante de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Agronomía Mesoamericana*, 854-868. <https://doi.org/10.15517/am.v32i3.45101>
- Zehra, A., Meena, M., Dubey, M. K., Aamir, M., & 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. *Botanical Studies*, 58(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0198-2>

13. ANEXOS

Derivado de este proyecto de tesis se realizó una publicación en la revista internacional *Horticulturae*, en el número especial: Strategies of Producing Horticultural Crops Under Climate Change.

Osorno-Suárez, M. d. P., Hernández-Soto, I., Aquino-Torres, E., Reyes-Santamaría, M. I., Madariaga-Navarrete, A., Sánchez-Rangel, D., & Saucedo-García, M. (2025). *Trichoderma asperellum* enhances low-temperature tolerance of tomato plants by regulating oxidative stress, osmolyte accumulation, and stomatal traits. *Horticulturae*, 11(12), 1502. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11121502>

Article

Trichoderma asperellum Enhances Low-Temperature Tolerance of Tomato Plants by Regulating Oxidative Stress, Osmolyte Accumulation, and Stomatal Traits

María del Pilar Osorno-Suárez ¹, Iridiam Hernández-Soto ¹, Eliazar Aquino-Torres ¹,
Ma Isabel Reyes-Santamaría ¹, Alfredo Madariaga-Navarrete ¹, Diana Sánchez-Rangel ² and
Mariana Saucedo-García ^{1,*}

- ¹ Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo-Santiago Tulantepec, Tulancingo 43600, Hidalgo, Mexico; os281135@uah.edu.mx (M.d.P.O.-S.); iridiam_hernandez@uah.edu.mx (I.H.-S.); equino@uah.edu.mx (E.A.-T.); maisabel_reyes5598@uah.edu.mx (M.I.R.-S.); alfredo_madariaga@uah.edu.mx (A.M.-N.)
² Investigadora por México-SECIHTI, Laboratorios de Fitopatología y Biología Molecular, Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A.C., Xalapa 91073, Veracruz, Mexico; diana.sanchez@inecol.mx
* Correspondence: saucedo@uah.edu.mx



Academic Editors:
Adrián Rodríguez-Burruero and
Carla Gujardo-Real

Received: 14 November 2025
Revised: 5 December 2025
Accepted: 7 December 2025
Published: 11 December 2025

Citation: Osorno-Suárez, M.d.P.; Hernández-Soto, I.; Aquino-Torres, E.; Reyes-Santamaría, M.I.; Madariaga-Navarrete, A.; Sánchez-Rangel, D.; Saucedo-García, M. *Trichoderma asperellum* Enhances Low-Temperature Tolerance of Tomato Plants by Regulating Oxidative Stress, Osmolyte Accumulation, and Stomatal Traits. *Horticulturae* **2025**, *11*, 1502. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11121502>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

Low temperature is one of the major environmental challenges for most crops, especially those of tropical and semitropical origin. The present work aimed to study low-temperature tolerance in tomato plants when these were previously inoculated with a *Trichoderma asperellum* strain. Here, it was demonstrated that tomato plants inoculated with the bioinoculant exhibited an alleviation of the injuries caused by low temperatures, with a 2.2-fold increase in plant survival. The increase in chilling tolerance was accompanied by a strong reduction in oxidative stress, but also by enhancements in proline and soluble sugar accumulation of at least 1.7-fold. Additionally, leaf stoma features were also measured, and it was found that both the bioinoculant and low temperatures increased leaf stomatal densities by 32% and 29%, respectively, and raised the stomatal index, while reducing stomatal area by 25–30%, suggesting that leaf traits may also contribute to alleviating the damage caused by low temperatures in tomato plants. The results of the present study demonstrate that *T. asperellum* provokes physiological and biochemical changes in tomato plants that together enhance tolerance to low temperature, leading us to propose the use of *T. asperellum* as an agroecological strategy to combat crop damage under low temperatures.

Keywords: bioinoculants; chilling; cold; proline; soluble sugars; reactive oxygen species; stomatal density; stomatal index; stoma size; tolerance

1. Introduction

To date, global warming has intensified the frequency and severity of the effects exerted by both biotic and abiotic stressors on crops, posing a significant threat to agricultural productivity and food security [1]. Among these, cold stress stands out as one of the primary abiotic factors limiting crop growth worldwide, negatively impacting yield and quality [2]. Currently, it is estimated that extreme temperatures together with other abiotic stresses reduce average crop yields by more than 50% and continue to be a risk to agricultural and forest production [3].

Geographic location and climate strongly influence plant tolerance to cold. Native plants from warmer climates, such as tomato (*Solanum lycopersicum*), are generally more

susceptible to low temperatures (LT). Plants are classified as freezing-tolerant, chilling-tolerant, and chilling-sensitive [4], with tomato belonging to the chilling-sensitive group [5]. Most commercial tomato cultivars exhibit growth inhibition below 15 °C, with temperatures under 12 °C causing marked development impairment [6,7]. LT reduces agronomic traits including growth rate, leaf area, number of new leaves, stem diameter, biomass, fruit yield, and lycopene and β -carotene content in the fruit [8–10]. Physiological and biochemical disturbances include decreased chlorophyll, reduced photosynthetic efficiency, membrane instability evidenced by electrolyte leakage, and a strong oxidative burst caused by Reactive Oxygen Species (ROS), which become toxic at high concentrations [11].

Given that tomatoes are among the most widely cultivated horticultural crops, with a production exceeding 192 million tonnes [12], efforts have focused on breeding cold-tolerant varieties. Nevertheless, recent studies have explored other alternatives to mitigate LT damage, including foliar applications of phenolic compounds [13], selenium, and brassinosteroids [14]. The use of soil microorganisms has also emerged as a promising and sustainable alternative to enhance plant tolerance to extreme temperatures, within the broader context of global environmental change [6,15].

Trichoderma spp. are considered plant growth-promoting fungi (PGPFs) due to their rhizosphere residence and beneficial interactions with host plants [16]. Several *Trichoderma* species are well known to suppress pathogenic fungi through nutrient competition, mycoparasitism, and antibiosis [17]. *Trichoderma* spp. also induces plant defenses through local and systemic responses in host plants by modulating the levels of phytohormones such as indol-3-acetic acid (IAA), salicylic acid (SA), cytokinin (CTK), gibberellin (GA), jasmonic acid (JA), ethylene (ET), and abscisic acid (ABA) originated by both fungi [18,19] and plants [20–24].

The signaling pathways activated by molecules derived from both plants and *Trichoderma* share a common mechanism in fine-tuning ROS levels through enzymatic or non-enzymatic systems [25–27], thereby preventing the excessive accumulation of ROS. The moderate ROS levels promoted by *Trichoderma* spp. are essential for effectively mitigating injuries caused by stressful conditions [28].

On the other hand, proline is an amino acid that plays beneficial roles in stressed plants, functioning as an osmolyte, a metal chelator, and both an antioxidative and signaling molecule [29]. Non-toxic accumulation of proline leads to an improvement in osmotic adjustment and the integrity of membranes and proteins. Additionally, proline accumulation prevents electrolyte leakage and the oxidative burst by increasing antioxidant enzymatic activities such as those of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), and peroxidase [29,30]. Although the role of proline's action in modulating ROS levels is still under investigation, the present study aimed to evaluate the effect of *T. asperellum* on ROS production and on the accumulation of the osmoprotectants proline and soluble sugars, in order to determine their relationship.

This study also assessed several morphological traits (stomatal density and index, and stoma size) in tomato plants subjected to LT stress, since phenotypic plasticity is a key characteristic enabling plants to acclimate to different growth conditions [31]. A reduction in leaf area and plant growth—a common phenotypic response to low temperatures—allows plants to reduce transpiration [32,33], a process directly influenced by stomatal density and stomatal size [34,35]. Additionally, to optimize carbon fixation per unit water loss, plants can adjust stomatal pore aperture in the short term and modify stomatal traits such as stomatal density and stomatal size [36], where these last two have a negative relationship in many species [34,37,38]. While plants can regulate stomatal aperture within minutes, changes in stomatal density require days or weeks [31].

2. Materials and Methods

2.1. Plant Materials and Growth Conditions

Commercial tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Vita seeds were used for the study. The tomato seeds were germinated in a peat moss/vermiculite (7:3) mixture under a 24–30 °C/18 °C day/night cycle with natural light, and a relative humidity of 60%.

The seedlings and plants were irrigated with tap water or a nutritive solution on alternate days until stress treatment application.

2.2. Fungal Growth and Inoculation of Tomato Plants

T. asperellum was grown as previously described [39]. For the *T. asperellum* treatment of tomato plants, *T. asperellum* was cultivated in a sterile solid medium (oat 9%, kaolin 22%, vermiculite 43%, water 26%), incubated at 25 °C for 5 days, and shaken daily. Three-week-old tomato plants were treated with *T. asperellum* grown in the solid medium at a final concentration of 1×10^7 spores/g soil by mixing it with peat moss and vermiculite (7:3 v/v) [39].

2.3. Low-Temperature Treatment

Six-week-old tomato plants were transferred to another growth chamber to apply LT at 4 °C. The control plants were kept in a growth chamber at room temperature (RT). The collection of plant material was carried out at 0, 3, 6, 9, and 12 days post-treatment.

2.4. Visual Damage

Visual differences of tomato plants exposed for 12 uninterrupted days to RT or LT were analyzed. For damage severity, five levels of damage were established based on the loss of leaf turgor: level 0 (healthy), level 1 (minor loss of turgor), level 2 (medium loss of turgor), level 3 (severe loss of turgor), and level 4 (total loss of leaf turgor or dead). The phenotype was determined by calculating the percentage of damaged leaflets in relation to the total number of leaflets of each plant. The survival rate was calculated by dividing the surviving plants by the total number of plants that were originally tested.

2.5. Histochemical Detection of Hydrogen Peroxide

Hydrogen peroxide detection was performed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining, as previously described [40], with minor modifications. Six-week-old tomato plants, not inoculated or inoculated with *T. asperellum*, were subjected to treatments at LT or RT for 3, 6, 9, and 12 days. The third leaf from the base was collected and immersed in 5 mL of DAB buffer solution (1 mg mL^{-1}) for 2 h. After staining, the DAB solution was replaced with 95% ethanol, and the samples were subsequently heated in boiling water for 10–15 min. The samples were then bleached in 95% ethanol three times until all the chlorophyll was completely removed. Finally, the tissues were fixed in a solution of ethanol/glycerol/acetic acid at a ratio of 3:1:1 (v/v/v) and photographed. H_2O_2 is visualized as a reddish-brown coloration.

2.6. Catalase Activity

Six-week-old tomato leaves (0.5 g), either inoculated or not inoculated with *T. asperellum*, and from both stressed and non-stressed plants, were homogenized in an ice-cold 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.6) supplemented with 1.0 mM EDTA and 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone. The homogenate was then centrifuged at 4 °C and 12,000 rpm for 20 min, and the supernatant was collected for enzymatic assays.

CAT activity was measured using the method described by Aebi et al. [41]. The reaction mixture for CAT activity consisted of 2 mL of 50 mM phosphate-buffered saline

(PBS, pH 7.0), 1 mL of 30 mM H₂O₂, and 50 µg of enzyme extract. The change in the absorbance of the reaction mixture at 240 nm was recorded every 1–3 min and is expressed as µmol H₂O₂ min⁻¹ mg protein⁻¹.

2.7. Soluble Sugar Content

All the collected leaf samples from the treatment and control were dried and weighed. The dried sample (0.1 g) was placed in glass vials which contained 5 mL of 80% (v/v) ethanol and then placed in a water bath heated at 30 °C for 30 min. The supernatant was recuperated after centrifugation at 4500 rpm, and the pellet was again placed in contact with 2.5 mL of 80% ethanol in a water bath for 30 min at 30 °C. After centrifugation, the supernatant was mixed with the other supernatant. Therefore, a 0.2% anthrone solution was added to each sample, and the mixture was heated at 100 °C for 10 min, followed by cooling at room temperature. The absorbance of the reaction solution was measured at 620 nm. The soluble sugar concentration in the extract was determined by comparison with a standard curve using the criterion of glucose. Results are expressed as mg soluble sugar/g DW [42].

2.8. Proline Content

The content of free proline was determined using the modified Bates et al. method [43]. A leaf sample (0.1 g) was homogenized in 2 mL of 3% sulfosalicylic acid using a mortar and pestle. The homogenate was centrifuged at maximum speed in a benchtop centrifuge for 5 min. Aliquots of 0.1 mL from the supernatant were mixed with 0.1 mL of 3% sulfosalicylic acid, 0.1 mL of acid ninhydrin solution (25 mg mL⁻¹), and 0.2 mL of acetic acid, and the mixture was placed on a shaker for 20 min. The samples were heated at 90 °C for 60 min and then cooled in an ice water bath. After cooling, the mixture was thoroughly mixed with 1 mL of toluene and allowed to stand at RT for 5 min to facilitate phase separation. The upper layer of the resulting mixture was used to measure the absorbance at 520 nm using a UV-VIS spectrophotometer (T60 UV/VIS, PG instruments, Leicestershire, UK). Six plants were used as independent samples for each treatment. The proline concentration was determined from a calibration curve and is expressed as µg proline g⁻¹ fresh weight (FW).

2.9. Stomatal Traits

For the analysis of stomatal traits, we selected the third leaf from the base. Imprints were obtained using the nail polish method (NP method) [44], which involves applying nail polish to the leaf surface to create an imprint. After allowing the polish to dry, we carefully peeled it off using adhesive cellophane tape and then examined the leaf imprint under a light microscope.

We obtained one imprint from the abaxial leaf surface of each of the three plants per treatment. For every imprint, we took ten photographs at different locations on the slide. In each image, the number of stomata was recorded, excluding those that were cut off by the edges of the frame. Stomatal density was defined as the number of stomata per unit leaf area, expressed as stomata per mm² (pores mm⁻²). The stomatal index was calculated by the formula described by Poole and Kürschner (1999) [45]:

$$\text{Stomatal index} = \frac{\text{stomata number}}{\text{stomata number} + \text{epidermal cell number}} \times 100\%, \quad (1)$$

For each photograph, we selected five stomata for the manual measurement of length and width using the image processing ImageJ 1.50i software with the Rectangle selection tool. Stomatal size was defined as the area of an ellipse, calculated from the lengths of the major and minor axes, including the size of the pore within.

2.10. Spore Abundance Counting

To quantify the *T. asperellum* population in the growing medium, one gram of a soil mixture containing the solid substrate inoculated with *T. asperellum* was collected from pots with plants maintained at cold temperatures. These samples were then diluted in an isotonic solution in a serial way, and aliquots were plated on potato dextrose agar (PDA) supplemented with 50 mg L⁻¹ of rose Bengal and 10% streptomycin sulfate. The medium was adjusted to a pH of 4.9 using lactic acid. The plates were incubated at 28 °C for 5 days, after which the spore abundance per gram of soil was counted. Dilutions were selected to ensure that the number of spores on the agar plates fell within the optimal range of 30 to 300 spores per plate. The data are expressed as Log number of spores per gram of dry substrate [46].

2.11. Evaluation of the Effect of Temperature on the Mycelial Growth Rate of *Trichoderma asperellum*

Mycelial plugs (6 mm in diameter) obtained from the actively growing margins of 7-day-old colonies were transferred to the center of Petri dishes containing PDA (one plug per plate). The plates were incubated in the dark at 4 and 28 °C in a controlled-environment growth chamber. After 7 days of incubation, the extension of the colony's diameter was measured. The plates incubated at LT were placed at 28 °C for 3 days to measure the colony diameter again [47].

2.12. Statistical Analysis

The data are expressed as mean ± standard deviation (SD) for three–six replicates in each group. The significance of differences among the treatments was evaluated by using the Tukey HSD test ($p < 0.05$). The analyses were performed by using Minitab®14 statistical software for windows.

3. Results

3.1. *Trichoderma asperellum* Enhances Low-Temperature Tolerance in Tomato

To investigate the phenotypical changes in tomatoes during LT stress tolerance in combination with *T. asperellum* treatment, three-week-old tomato plants were inoculated, and three weeks later, the plants were exposed to LT conditions. After 12 days of LT stress, both *T. asperellum*-inoculated and -uninoculated plants exhibited symptoms of LT stress, including chlorosis and wilting. However, the *T. asperellum*-inoculated plants showed fewer symptoms than those of the non-inoculated plants (Figure 1a). To determine how LT stress affected the tomato plants—with or without *T. asperellum* inoculation—leaf damage severity was evaluated 12 days post-treatment (Figure 1b). The results are expressed as the percentage of damaged leaflets per plant. Leaf damage was quantified using a five-level severity scale that classified damage based on the loss of leaflet turgor. As shown in Figure 1b, inoculation with *T. asperellum* mitigated the leaf damage severity provoked by LT compared to non-inoculated plants. The predominant damage level in inoculated plants was Level 1, observed in 61% of the cases, whereas non-inoculated plants exhibited higher damage levels, primarily in Levels 3 and 4, with incidences of 28% and 32%, respectively. When these plants were returned to optimal growth conditions for 14 days, tomato plants inoculated with *T. asperellum* exhibited an approximately 2.2-fold increase in survival rate compared to that of non-inoculated plants (Figure 1c).

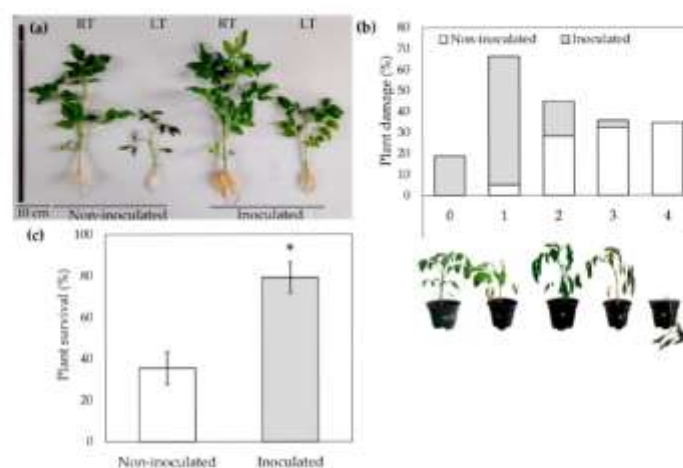


Figure 1. Low-temperature tolerance is induced by *T. asperellum* in tomato plants. (a) Representative plants grown under room temperature (RT) or exposed to 4 °C (LT) for 12 days. The inoculation of tomato plants with *T. asperellum* was performed 3 weeks prior to LT treatment. (b) The severity of leaf damage was assessed using a five-level scale based on the loss of leaf turgor: Level 0 (healthy), Level 1 (minor loss of turgor), Level 2 (medium loss of turgor), Level 3 (severe loss of turgor), and Level 4 (total loss of turgor). The accompanying photographs illustrate a representative example of each damage level. LT-induced leaf damage was quantified as the percentage of the leaflets exhibiting symptoms relative to the total number of leaves in each plant 12 days after treatment. The data presented are the average of five independent experiments, with each consisting of 3 plants. (c) Percent survival rates of tomato plants exposed for 12 days at 4 °C and then returned to RT for 14 days for their recuperation; mean and standard deviation (sd) from three independent experiments are presented. The asterisk indicates statistically significant differences, as determined by a Student's *t*-test (* $p < 0.01$).

3.2. *Trichoderma asperellum* Decreases LT-Induced ROS Accumulation

Since *T. asperellum* improves LT stress tolerance in tomato, it was expected that the bioinoculant could be affecting ROS accumulation in tomato plants under LT stress conditions. To investigate this, ROS accumulation was visualized using DAB staining. As shown in Figure 2a, DAB staining showed that H_2O_2 accumulation remained at low levels under normal conditions of growth and no differences could be observed between non-inoculated and inoculated plants. However, after exposure to LT for 3, 6, 9, and 12 days, the H_2O_2 accumulation increased to higher levels in non-inoculated plants, but it remained at lower levels in inoculated plants. These results indicated that *T. asperellum* decreased LT-induced ROS accumulation.

To understand the mechanism by which *T. asperellum* regulates ROS production, the role of the antioxidant activity of catalase (CAT) following exposure to LT was analyzed. Figure 2b shows that the lowest activity of CAT was observed in the plants grown at RT with or without *T. asperellum*, while the highest CAT activity was observed in non-inoculated plants exposed to LT, followed by the inoculated plants under LT stress.

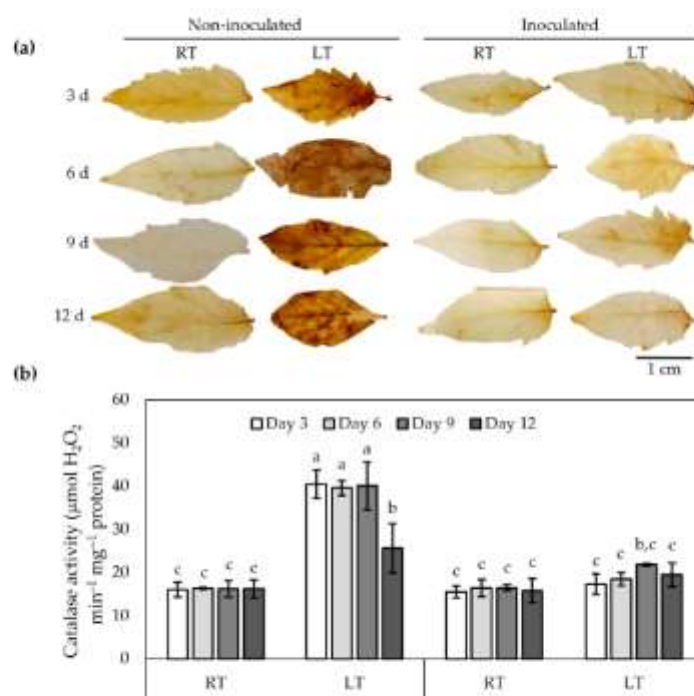


Figure 2. *Trichoderma asperellum* reduces LT-induced ROS accumulation in tomato plants. (a) Analyses of DAB staining in six-week-old tomato leaves treated under RT or LT conditions. (b) Catalase activity in tomato plants under LT stress. The values are the means of three independent experiments with three replicates. Error bars indicate 5D. The statistical significance ($p < 0.05$) was calculated with a Tukey test. The columns with different letters indicate significant differences.

3.3. *Trichoderma asperellum* Promotes Overaccumulation of Proline and Total Soluble Sugars Content in Tomato Plants Under Low Temperature

Proline is an amino acid that is positively correlated with plant tolerance in response to various stress conditions [29]. The measurement of the proline content of tomato plants revealed a significant increase in plants exposed to LT stress, which was further enhanced by inoculation with *T. asperellum* (Figure 3a). The highest increase in the proline content was observed after 12 days of LT treatment, where plants pretreated with *T. asperellum* showed a 2.1-fold increase in proline content in stressed leaves, compared to stressed but non-inoculated leaves.

On the other hand, the content of total soluble sugars, which are considered an osmoprotectant, increased by 41% when the plants were treated with *T. asperellum* alone and increased by 50% when treated in combination with LT for 12 days, in comparison with their respective control plants, indicating that *T. asperellum* induces the production of osmolytes to promote homeostasis maintenance during LT stress.

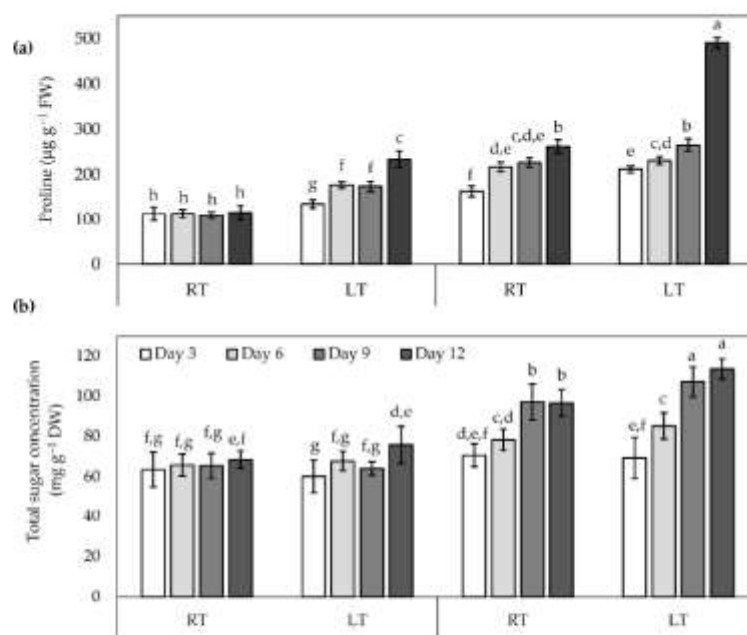


Figure 3. *Trichoderma asperellum* enhances the accumulation of osmolytes during LT stress. Content of (a) proline and (b) total soluble sugar in tomato leaves under low temperatures. All experiments were performed in triplicate for three independent experiments. Values are presented as means \pm SDs. Different letters denote significant differences between means according to Tukey's HSD post hoc test, $p \leq 0.05$.

3.4. Analysis of Stomatal Traits in Tomato Inoculated with *Trichoderma Asperellum* and Treated with Low Temperatures

Previously, we reported that LT dramatically diminished the leaf area and succulence of non-inoculated tomato plants, but did so at a minor level in inoculated plants [9], so this study investigated whether stoma cells could be contributing to the enhanced LT tolerance induced by *T. asperellum*. For that, we analyzed the stomatal traits, including stomatal density, stomatal index and stomatal size, of tomato plants treated with or without *T. asperellum* and under LT stress conditions.

As shown in Figure 4, *T. asperellum*, in the absence of abiotic stress, increased the stoma number and decreased the stoma size, compared with uninoculated plants, indicating that *T. asperellum* by itself is modifying the leaf morphological traits of tomato plants. Regarding the application of stress for 9 days, the stoma density significantly increased in both uninoculated and inoculated plants by 44.2% and 29.3%, compared with their respective controls (Figure 4a), while the increase in stoma index was lower (Figure 4b). Notably, LT stress significantly reduced the stomatal size after 9 days of treatment in uninoculated plants while stomatal area was slightly affected by LT stress in inoculated plants (Figure 4c).

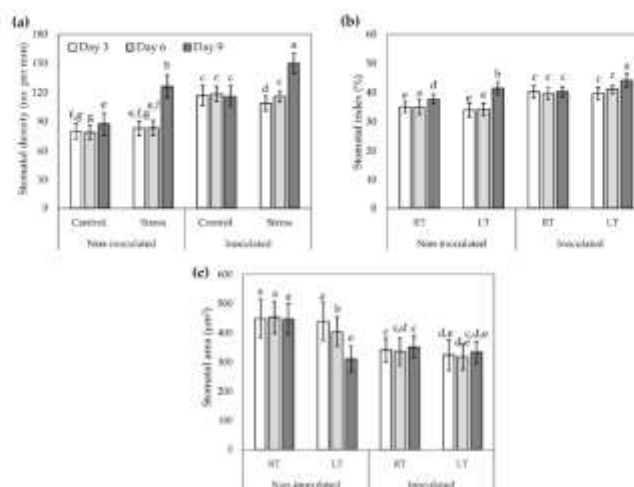


Figure 4. *Trichoderma asperellum* modifies stomatal traits related to the photosynthetic optimization in tomato plants under LT. Responses of (a) stomatal density, (b) stomatal index, and (c) stomatal area on abaxial leaf surface from tomato plant under room temperature (RT) or low temperature (LT). Values are presented as means \pm SDs. Different letters above bars indicate significant differences ($n = 30$).

3.5. *Trichoderma asperellum* Survives in Low-Temperature Conditions

The spore-counting assay is a widely used technique for estimating the number of viable fungal cells in any sample. As shown in Figure 5a, the number of spores of *T. asperellum* in the soil was conserved at LT at the studied times. The growth of the fungus in PDA revealed a strong growth inhibition at 4 °C; however, when the plates were returned to 28 °C, no differences in fungal growth were observed in reference to control conditions (28 °C), indicating that *T. asperellum* did not have lethal effects at LT.

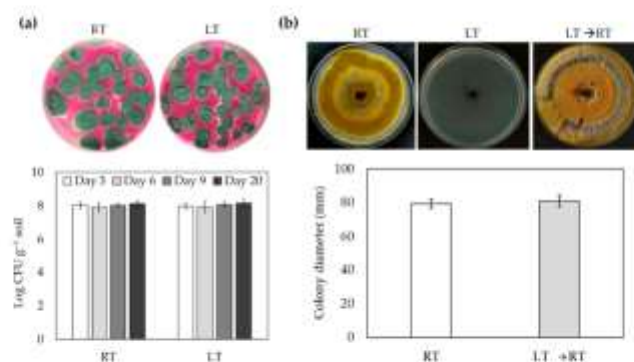


Figure 5. *Trichoderma asperellum* remains viable under LT exposure. Fungal viability in the growing medium of tomato plants (a) or semi-synthetic growth medium (b). (a) Number of spores per gram was quantified in soil samples collected from tomato plants under LT treatment. The population is expressed as Log number of spores/gram of soil. (b) Mycelial growth of *T. asperellum* at 28 °C (5 days), 4 °C (5 days) and 4 °C (5 days) + 28 °C (5 days). Values are presented as means \pm SDs from three independent experiments.

4. Discussion

Trichoderma spp. are an important fungal genus that could improve tolerance against LT stress in plants by inducing systemic resistance and stimulating plant growth.

Low temperatures are known to elevate the production of ROS, particularly in species with lower antioxidant capacities. The present study reported that the non-inoculated tomato plants experienced high levels of oxidative stress during LT stress, contrary to plants inoculated with *T. asperellum*, suggesting that the tolerance of tomato plants to LT stress is closely related to the accumulation of ROS.

Plants use antioxidant machinery to counter hazardous ROS levels and improve tolerance to adverse environments. The ROS can be scavenged by low-molecular-weight antioxidative metabolites, e.g., glutathione, ascorbic acid, and α -tocopherol, or by antioxidative enzymes, e.g., CAT, APX, and SOD. In this study, CAT activity was the only antioxidant parameter analyzed, and a strong increase was observed following the application of LT stress. The fact that uninoculated plants under LT stress showed a strong ROS accumulation even when the CAT activity was also increased suggests that the oxidative burst may have exceeded the potential antioxidant capacity. In contrast, the CAT activity was moderate in inoculated plants under LT. This result may be explained by (1) the involvement of other cellular sources of ROS detoxifiers (such as the production of proline, as described below), (2) a lesser production of ROS, and (3) the production of SA by the fungus and/or by the plant, which has the ability to inhibit CAT activity [48,49].

In the present study, proline accumulation in plants was explored since it has been documented that this metabolite can directly interact with ROS (mainly free radicals) [50,51] or generate antioxidant molecules through the ascorbate/glutathione (AsA-GSH) pathway during proline biosynthesis [52]. The results of this study showed that the plants inoculated with *T. asperellum* exhibited a marked increase of 50% in leaf proline content under low-temperature stress (Figure 3), which is in accordance with the effect of *T. harzianum* on proline accumulation in the enhancement of salt and LT tolerance in cucumber and tomato plants, respectively [53,54]. Additionally, the results also coincide with the increase in proline content and activation of the antioxidant machinery in plants inoculated with the psychrotolerant bacterial strains *Pseudomonas tancouverensis* OB155-gfp, *P. frederiksborgensis* OS261-gfp, *P. frederiksborgensis* OS211, and *Flavobacterium glaciei* OB146 to mitigate the damage provoked by LT in tomato plants [6,15].

Interestingly, it has been reported that *T. harzianum* is able to increase the expression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS), which encodes one of the enzymes involved in proline biosynthesis in tomato plants after cold treatment [54]. However, the downregulation of the expression of genes whose products are enzymes that act on proline catabolism cannot be excluded.

On the other hand, soluble sugars (sucrose glucose, fructose, and oligosaccharides) are another kind of metabolite that are related to LT tolerance. Soluble sugars are well documented molecules as osmolytes; however, these can also protect cell membranes from dehydration [55] and act as second messengers in signal transduction pathways [56,57]. The mechanism by which soluble sugars rise could be caused by the activation of invertase enzymes and sucrose synthases, as was shown in wheat seedlings during LT treatment [58].

The tomato plants treated with *T. asperellum* alone showed increased soluble sugar content, like the increase observed for proline, suggesting that *Trichoderma* could be inducing the gene expression or activity of plant enzymes related to the biosynthesis of both osmolytes, which would be greater in plants under adverse environmental conditions, to improve tolerance.

There are several studies revealing that drought stress leads to an increase in stomatal density and a decrease in stomatal size to minimize water loss while maintaining CO₂

assimilation [32,59]; however, little is known concerning this relationship regarding LT and bioinoculants.

Like drought stress, the stoma density increased in tomato leaves under LT stress, suggesting that an increase in stomatal density might be associated with the decrease in leaf size previously observed in tomato plants under LT stress [9], to optimize carbon fixation per unit water loss. By increasing stomatal density, the plant may be able to increase stomatal conductance and maximize CO₂ uptake, which could be beneficial for plant nutrient uptake and photosynthesis [31].

Previous studies have proposed that small stomata can adjust stomatal pore area, regulate stomatal conductance faster, and, thus, respond rapidly to environmental change, improving long-term water use efficiency and diminishing the risk of disruption to the leaf hydraulic system [60–62]. In leaves with many small pores, there are better gas conductance and a greater potential for photosynthesis than for leaves with fewer large stomata with the same pore area per unit leaf area [38]. In this study, LT stress led to a reduction in stoma size at 9 days, suggesting that the tomato plant under stress is modifying the phenotype of the guard cell size as an adaptation to protect itself from damage caused by environmental variations.

The inoculation of tomato plants with *T. asperellum* also led to the negative correlation between stomatal density and stomatal size in optimal growth conditions, and it was greater under stress conditions. These results suggest that *T. asperellum* can alter the anatomy and patterning of stomata. Recently, it was found that beneficial microorganisms, particularly endophytes, alter stomatal traits. For example, Salicacea-inoculated *Populus trichocarpa* had more compact stomata and an increase in stomatal density prior to and after water deficit [63]. Additionally, it has been shown that inoculation with *Burkholderia* sp. LD-11 or with Xerophyte-Derived Synthetic Bacterial Communities in maize improved water use efficiency, increased the sensitivity of stomatal gas conductance, and decreased the transpiration rate, promoting tolerance to water deficits [64,65].

The involved mechanism in stomatal density and stomata size provoked by *T. asperellum* inoculation is unknown, but it could be hypothesized that the bioinoculant may induce the expression or activation of transcription factors that regulate the cellular divisions and cell fate transitions necessary for stomatal development [31].

Soil microbial communities either respond immediately to changes in the environment or can adapt to prolonged periods of stress through physiological adjustments [66]. Recently, it has been demonstrated that cooling soils decreased microbial processes such as respiration and growth but had little to no effect on the uptake and respiration rate of amended glucose. This result is of great relevance because sugars are precursors of osmolytes and also act as osmolytes themselves. Additionally, a rise in unsaturated phospholipid fatty acids was also observed, which can be interpreted as a specific microbial community adaptation to cool temperatures by enhancing the flexibility of cell membranes [67].

In this study, the prevalence of *T. asperellum* in soils from plants exposed to LT was evaluated. The results did not show any significant changes in the fungal densities during abiotic stress compared to optimal conditions, suggesting that the viability of the fungus is maintained in cold soils for long periods (20 days); however, it remains unclear whether it can colonize the plants enough in cold conditions.

The temperature has a significant influence on the *in vitro* growth of *T. asperellum*, which has an optimal mycelial growth of 30 °C [47]. The growth of fungi in PDA at 4 °C was totally inhibited after 7 days, but when the fungus-containing plates were returned to optimal temperatures, the fungal growth was restored to the same rate as those plates grown at 28 °C (as was previously observed [47]), indicating that LT did not have lethal effects on the fungus.

5. Conclusions

Cold stress negatively affects the growth or survival of semitropical plants such as tomato, mainly due to increased oxidative stress. The inoculation of tomato plants with *T. asperellum* prevented oxidative stress caused by LT and improved plant survival. Moreover, the results of this study showed that *T. asperellum* increased the content of osmolytes involved in ROS scavenging and altered stomatal traits, which may help avoid excessive dehydration and enhance photosynthesis in plants under stressful conditions, revealing that *T. asperellum* may be a useful strategy for inducing LT tolerance by maintaining food security in response to climate change.

Author Contributions: Conceptualization, M.S.-G.; results and method development, M.d.P.O.-S.; statistical analysis, M.I.R.-S.; writing—original draft, M.S.-G.; writing—review and editing, D.S.-R. and A.M.-N.; supervision, E.A.-T., L.H.-S., M.I.R.-S., D.S.-R. and A.M.-N.; funding acquisition, M.S.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding. M.d.P.O.-S. received CONACyT (822722) fellowships.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors offer special thanks to Pip Eitel (Peace Corps) for the editing work and to the four anonymous reviewers for their comments and critiques.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ABA	Abscisic acid
APX	Ascorbate peroxidase
CAT	Catalase
ET	Ethylene
GA	Gibberellin
JA	Jasmonic acid
LT	Low Temperature
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Room Temperature
SA	Salicylic acid
SOD	Superoxide Dismutase

References

1. Tanaka, K.; Mudgil, Y.; Tunc-Ozdemir, M. Editorial: Abiotic stress and plant immunity—A challenge in climate change. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, 1197435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Guan, Y.; Hwarari, D.; Korboe, H.M.; Ahmad, B.; Cao, Y.; Movahedi, A.; Yang, L. Low temperature stress-induced perception and molecular signaling pathways in plants. *Environ. Exp. Bot.* **2023**, *207*, 105190. [[CrossRef](#)]
3. Devireddy, A.R.; Tschaplinski, T.J.; Tuskan, G.A.; Muchero, W.; Chen, J.-G. Role of reactive oxygen species and hormones in plant responses to temperature changes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Guy, C.L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **1990**, *41*, 187–223. [[CrossRef](#)]
5. Lyons, J.M. Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **1973**, *24*, 445–466. [[CrossRef](#)]
6. Subramanian, P.; Kim, K.; Krishnamoorthy, R.; Mageswari, A.; Selvakumar, G.; Sa, T. Cold stress tolerance in psychrotolerant soil bacteria and their conferred chilling resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under low temperatures. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161592. [[CrossRef](#)]

7. Van Ploeg, D.; Heuvelink, E. Influence of sub-optimal temperature on tomato growth and yield: A review. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **2005**, *80*, 652–659. [\[CrossRef\]](#)
8. Khan, T.A.; Fariduddin, Q.; Yusuf, M. *Lycopersicon esculentum* under low temperature stress: An approach toward enhanced antioxidants and yield. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 14178–14188. [\[CrossRef\]](#)
9. Cornejo-Ríos, K.; Osomo-Suárez, M.d.P.; Hernández-León, S.; Reyes-Santamaría, M.I.; Juárez-Díaz, J.A.; Pérez-España, V.H.; Peláez-Acero, A.; Madariaga-Navarrete, A.; Saucedo-García, M. Impact of *Trichoderma asperellum* on chilling and drought stress in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Horticulturae* **2021**, *7*, 385. [\[CrossRef\]](#)
10. Sherzod, R.; Yang, E.Y.; Cho, M.C.; Chae, S.Y.; Kim, J.H.; Nam, C.W.; Chae, W.B. Traits affecting low temperature tolerance in tomato and its application to breeding program. *Plant Breed. Biotechnol.* **2019**, *7*, 350–359. [\[CrossRef\]](#)
11. Quan, L.-J.; Zhang, B.; Shi, W.-W.; Li, H.-Y. Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.* **2008**, *50*, 2–18. [\[CrossRef\]](#)
12. FAOSTAT. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (accessed on 11 June 2025).
13. Meena, Y.K.; Khurana, D.S.; Kaur, N.; Singh, K. Phenolic compounds enhanced low temperature stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Curr. J. Appl. Sci. Technol.* **2017**, *20*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
14. Saeed, T.; Alam Khan, T.; Ahmad, A.; Yusuf, M.; Kappachery, S.; Fariduddin, Q.; Mudgal, G.; Gururani, M.A. Exploring the effects of selenium and brassinosteroids on photosynthesis and protein expression patterns in tomato plants under low temperatures. *Plants* **2023**, *12*, 3351. [\[CrossRef\]](#)
15. Subramanian, P.; Mageswari, A.; Kim, K.; Lee, Y.; Sa, T. Psychrotolerant endophytic *Pseudomonas* sp. strains OB155 and OS261 induced chilling resistance in tomato plants (*Solanum lycopersicum* Mill.) by activation of their antioxidant capacity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2015**, *28*, 1073–1081. [\[CrossRef\]](#)
16. Hossain, M.M.; Sultana, F.; Islam, S. Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF): Phytostimulation and induced systemic resistance. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*; Singh, D.P., Singh, H.B., Prabha, R., Eds.; Microb. Interact. Agro-Ecol. Impacts; Springer: Singapore, 2017; Volume 2, pp. 135–191. [\[CrossRef\]](#)
17. Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species—Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 43–56. [\[CrossRef\]](#)
18. Chancud, E.; Morel, J.-B. Plant hormones: A fungal point of view. *Mol. Plant Pathol.* **2016**, *17*, 1289–1297. [\[CrossRef\]](#)
19. Illescas, M.; Pedrero-Méndez, A.; Pitorini-Bovolini, M.; Hermosa, R.; Monte, E. Phytohormone production profiles in *Trichoderma* species and their relationship to wheat plant responses to water stress. *Pathogens* **2021**, *10*, 991. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Jogaiah, S.; Abdelrahman, M.; Tran, L.-S.P.; Ito, S.-I. Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against *Fusarium* wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Mol. Plant Pathol.* **2018**, *19*, 870–882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Yuan, M.; Huang, Y.; Ge, W.; Jia, Z.; Song, S.; Zhang, L.; Huang, Y. Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 144. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Agostini, R.B.; Postigo, A.; Rius, S.P.; Rech, G.E.; Campos-Bermudez, V.A.; Vargas, W.A. Long-lasting primed state in maize plants: Salicylic acid and steroid signaling pathways as key players in the early activation of immune responses in silks. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2019**, *32*, 95–106. [\[CrossRef\]](#)
23. Contreras-Cornejo, H.A.; Macías-Rodríguez, L.; Beltrán-Peña, E.; Herrera-Estrella, A.; López-Bucio, J. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant Signal Behav.* **2011**, *6*, 1554–1563. [\[CrossRef\]](#)
24. Kottb, M.; Gigolashvili, T.; Grobkinsky, D.K.; Piechulla, B. *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: From inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 995. [\[CrossRef\]](#)
25. Chen, S.-C.; Ren, J.-J.; Zhao, H.-J.; Wang, X.-L.; Wang, T.-H.; Jin, S.-D.; Wang, Z.-H.; Li, C.-Y.; Liu, A.-R.; Lin, X.-M.; et al. *Trichoderma harzianum* improves defense against *Fusarium oxysporum* by regulating ROS and RNS metabolism, redox balance, and energy flow in cucumber roots. *Phytopathology* **2019**, *109*, 972–982. [\[CrossRef\]](#)
26. Fu, J.; Liu, Z.; Li, Z.; Wang, Y.; Yang, K. Alleviation of the effects of saline-alkaline stress on maize seedlings by regulation of active oxygen metabolism by *Trichoderma asperellum*. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179617. [\[CrossRef\]](#)
27. Pacheco-Trejo, J.; Aquino-Torres, E.; Reyes-Santamaría, M.I.; Islas-Pelcastre, M.; Pérez-Ríos, S.R.; Madariaga-Navarrete, A.; Saucedo-García, M. Plant defensive responses triggered by *Trichoderma* spp. as tools to face stressful conditions. *Horticulturae* **2022**, *8*, 1181. [\[CrossRef\]](#)
28. Zhang, S.; Gan, Y.; Xu, B. 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.* **2016**, *7*, 1405. [\[CrossRef\]](#)
29. Hayat, S.; Hayat, Q.; Alyemeni, M.N.; Wani, A.S.; Fichtel, J.; Ahmad, A. Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behav.* **2012**, *7*, 1456–1466. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

30. Ritonga, F.N.; Chen, S. Physiological and molecular mechanisms involved in cold stress tolerance in plants. *Plants* **2020**, *9*, 560. [CrossRef] [PubMed]
31. Hasanuzzaman, M.; Zhou, M.; Shabala, S. How does stomatal density and residual transpiration contribute to osmotic stress tolerance? *Plants* **2023**, *12*, 494. [CrossRef]
32. Xu, Z.; Zhou, G. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 3317–3325. [CrossRef] [PubMed]
33. Lei, Z.Y.; Han, J.M.; Yi, X.P.; Zhang, W.F.; Zhang, Y.L. Coordinated variation between veins and stomata in cotton and its relationship with water-use efficiency under drought stress. *Photosynthetica* **2018**, *56*, 1326–1335. [CrossRef]
34. Franks, P.J.; Beerling, D.J. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10343–10347. [CrossRef] [PubMed]
35. Liu, C.; Li, Y.; Zhang, J.; Baird, A.S.; He, N. Optimal community assembly related to leaf economic-hydraulic-anatomical traits. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 341. [CrossRef]
36. Liu, C.; Sack, L.; Li, Y.; Zhang, J.; Yu, K.; Zhang, Q.; He, N.; Yu, G. Relationships of stomatal morphology to the environment across plant communities. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 6629. Erratum in *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 439. [CrossRef]
37. Hetherington, A.M.; Woodward, F.I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **2003**, *424*, 901–908. [CrossRef]
38. Franks, P.J.; Drake, P.L.; Beerling, D.J. Plasticity in maximum stomatal conductance constrained by negative correlation between stomatal size and density: An analysis using *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell Environ.* **2009**, *32*, 1737–1748. [CrossRef] [PubMed]
39. Herrera-Téllez, V.L.; Cruz-Olmedo, A.K.; Plasencia, J.; Gavilanes-Ruiz, M.; Arce-Cervantes, O.; Hernández-León, S.; Saucedo-García, M. The protective effect of *Trichoderma asperillum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2007. [CrossRef]
40. Thordal-Christensen, H.; Zhang, Z.; Wei, Y.; Collinge, D.B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—Powdery mildew interaction. *Plant J.* **1997**, *11*, 1187–1194. [CrossRef]
41. Aebi, H. Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: New York, NY, USA, 1984; Volume 105, pp. 121–126. [CrossRef]
42. Khan, A.A.; McNeilly, T.; Collins, J.C. Accumulation of amino acids, proline, and carbohydrates in response to aluminum and manganese stress in maize. *J. Plant Nutr.* **2000**, *23*, 1303–1314. [CrossRef]
43. Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* **1973**, *39*, 205–207. [CrossRef]
44. Ceulemans, R.; Van Praet, L.; Jiang, X.N. Effects of CO₂ enrichment, leaf position and clone on stomatal index and epidermal cell density in poplar (*Populus*). *New Phytol.* **1995**, *131*, 99–107. [CrossRef] [PubMed]
45. Poole, I.; Kürschner, W. Stomatal density and index: The practice. In *Fossil Plants and Spores: Modern Techniques*; The Geological Society: London, UK, 1999; pp. 257–260.
46. Martínez-Medina, A.; Roldán, A.; Pascual, J.A. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: Growth response and *Fusarium* wilt biocontrol. *Appl. Soil. Ecol.* **2011**, *47*, 98–105. [CrossRef]
47. Cavalcante, A.L.A.; Negreiros, A.M.P.; Melo, N.J.d.A.; Santos, F.J.Q.; Silva, C.S.A.S.; Pinto, P.S.L.; Khan, S.; Sales, I.M.M.; Júnior, R.S. Adaptability and sensitivity of *Trichoderma* spp. isolates to environmental factors and fungicides. *Microorganisms* **2025**, *13*, 1689. [CrossRef]
48. Klessig, D.E.; Tian, M.; Choi, H.W. Multiple targets of salicylic acid and its derivatives in plants and animals. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 206. [CrossRef]
49. Durner, J.; Klessig, D.E. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28492–28501. [CrossRef]
50. Smirnov, N.; Cumbes, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1057–1060. [CrossRef]
51. Signorelli, S.; Coitiño, E.L.; Borsani, O.; Monza, J. Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: Insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 37–47. [CrossRef]
52. Hare, P.D.; Cress, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* **1997**, *21*, 79–102. [CrossRef]
53. Zhang, F.; Wang, Y.; Liu, C.; Chen, F.; Ge, H.; Tian, F.; Yang, T.; Ma, K.; Zhang, Y. *Trichoderma harzianum* mitigates salt stress in cucumber via multiple responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *170*, 436–445. [CrossRef]
54. Ghorbanpour, A.; Salimi, A.; Ghanbary, M.A.T.; Pirdashti, H.; Dehestani, A. The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Sci. Hortic.* **2018**, *230*, 134–141. [CrossRef]
55. Anchordoguy, T.J.; Rudolph, A.S.; Carpenter, J.F.; Crowe, J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* **1987**, *24*, 324–331. [CrossRef]

56. Sakr, S.; Wang, M.; Dédaldéchamp, F.; Perez-García, M.-D.; Ogé, L.; Hamama, L.; Atanassova, R. The sugar-signaling Hub: Overview of regulators and interaction with the hormonal and metabolic network. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2506. [\[CrossRef\]](#)
57. Yuanyuan, M.; Yali, Z.; Jiang, L.; Hongbo, S. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 2004–2010. [\[CrossRef\]](#)
58. Abdel-Latif, A. Activity of sucrose synthase and acid invertase in wheat seedlings during a cold-shock using micro plate reader assays. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **2008**, *2*, 53–56.
59. Quarrie, S.A.; Jones, H.G. Effects of abscisic acid and water stress on development and morphology of wheat. *J. Exp. Bot.* **1977**, *28*, 192–203. [\[CrossRef\]](#)
60. Drake, P.L.; Froend, R.H.; Franks, P.J. Smaller, faster stomata: Scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 495–505. [\[CrossRef\]](#)
61. Raven, J.A. Speedy small stomata? *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 1415–1424. [\[CrossRef\]](#)
62. Zhang, S.-B.; Guan, Z.-J.; Sun, M.; Zhang, J.-J.; Cao, K.-F.; Hu, H. Evolutionary association of stomatal traits with leaf vein density in *Paphiopedilum*, Orchidaceae. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40080. [\[CrossRef\]](#)
63. Hendrickson, M.; Banan, D.; Tournay, R.; Bakker, J.D.; Doty, S.L.; Kim, S.-H. *Salicaceae* endophyte inoculation alters stomatal patterning and improves the intrinsic water-use efficiency of *Populus trichocarpa* after a water deficit. *J. Exp. Bot.* **2025**, *76*, 3499–3514. [\[CrossRef\]](#)
64. Fan, X.; Hu, H.; Huang, G.; Huang, F.; Li, Y.; Palta, J. Soil inoculation with *Burkholderia* sp. LD-11 has positive effect on water-use efficiency in inbred lines of maize. *Plant Soil.* **2015**, *390*, 337–349. [\[CrossRef\]](#)
65. Chukwudi, U.P.; Babalola, O.O.; Glick, B.R.; Santoyo, G.; Rigobelo, E.C. Field application of beneficial microbes to ameliorate drought stress in maize. *Plant Soil.* **2025**. [\[CrossRef\]](#)
66. Jansson, J.K.; Hofmockel, K.S. Soil microbiomes and climate change. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 35–46. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Schneckler, J.; Spiegel, F.; Li, Y.; Richter, A.; Sandén, T.; Spiegel, H.; Zechmeister-Boltenstern, S.; Fuchslueger, L. Microbial responses to soil cooling might explain increases in microbial biomass in winter. *Biogeochemistry* **2023**, *164*, 521–535. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.