

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de concentraciones de NaCl sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams en medio PDA y suelo

Wilson G. Ceiro^I, Jersys Arévalo^{II}, Ana L. Puertas^I, Leopoldo Hidalgo-Díaz^{II}

^IFacultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Km 17½ carretera Bayamo-Manzanillo, Bayamo, Granma, Cuba.

Correo electrónico: wceiroc@udg.co.cu; ^{II}Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Las sales presentes en aguas y suelos agrícolas, pueden conferirle efectos desfavorables a los agentes microbianos utilizados para el control de plagas presentes en el agroecosistema. Por esta razón, se propuso determinar los efectos de las concentraciones de NaCl sobre el desarrollo micelial y la esporulación de *P. chlamydosporia* en medio PDA y suelo. Para ello, se realizaron dos ensayos por separado y los tratamientos consistieron en cuatro concentraciones de NaCl (40, 80, 120 y 160 mmol.L⁻¹) y un control. Se determinó la inhibición del crecimiento micelial y la esporulación, las mismas se analizaron mediante ANOVA unifactorial y se compararon con la prueba de Duncan. En el primer ensayo, la menor inhibición se obtuvo a la concentración de 40 mmol.L⁻¹ de NaCl, la cual afectó el área de la colonia en 6,55%, la esporulación en 21,57% y el tratamiento de 160 mmol.L⁻¹ causó las mayores afectaciones con valores de 51,35% y 85,17%, respectivamente. En el segundo ensayo, la menor inhibición del área de la colonia 11,59% se alcanzó con la concentración de 40 mmol.L⁻¹ y la mayor 33,50% se constató a 160 mmol.L⁻¹. En todas las concentraciones de NaCl evaluadas *P. chlamydosporia* produjo clamidosporas sobre el suelo Fluvisol. Los resultados obtenidos señalaron las potencialidades que posee este hongo de persistir y proliferar bajo los efectos de altas concentraciones de NaCl en medio PDA y suelo, convirtiéndolo en un candidato promisorio para el biomanejo de *Meloidogyne* spp., en agroecosistemas con problemas de salinidad.

Palabras clave: control biológico, *Meloidogyne* spp.

Effect of NaCl concentrations on the micelial growth of *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare and Gams in PDA medium and soil

ABSTRACT: The salts present in water and soil dedicated to agriculture may confer unfavorable effects on microbial agents of pests control present in the agroecosystem. For this reason, it was proposed to determine the effects of NaCl concentration on the mycelial growth and sporulation of *Pochonia chlamydosporia* in PDA medium and soil. Two separate tests were performed, the treatments consisted in four NaCl concentrations (40, 80, 120 and 160 mmol.L⁻¹) and one control. The inhibition of the mycelial growth and sporulation was determined; this was analyzed using univariate ANOVA and compared by Duncan's test. In the first assays, the lower inhibition of the colony area (6.55%) and sporulation (21.57%) was obtained at a concentration of 40 mmol.L⁻¹ of NaCl, and the greatest affectation was recorded at 160 mmol.L⁻¹ with values of 51.35% and 85.17%, respectively. In the second assays, the lowest inhibition of the colony area (11.59%) was achieved at a concentration of 40 mmol.L⁻¹, and the greatest affectation (33.50%) was found at 160 mmol.L⁻¹. The fungus produced chlamydo spores in the Fluvisol soil at all the concentrations of NaCl used. The results showed the potential of *P. chlamydosporia* to persist and proliferate under the effect of high concentrations of NaCl on PDA medium and the soil tested. This fungus has been indicated as a promissory candidate for biomanagement of *Meloidogyne* spp., in agroecosystems with salinity problems.

Key words: biological control agents, *Meloidogyne* spp.

INTRODUCCIÓN

La presencia de sales en los suelos y en las aguas utilizadas en la agricultura, constituyen uno de los problemas contemporáneos más serios que enfrenta el sector agrícola a nivel mundial (1). De acuerdo con la FAO, el 6% de las tierras están afectadas por sales, con más de 800 millones de hectáreas en todo el mundo. Las mayores incidencias se localizaron en Asia, Pacífico y Australia (6,3%), seguido por Europa del Este (5,1%) y América Latina (3,0%) (2).

Cuba, no escapa a esta preocupante situación, donde se diagnosticó que el 15% del total de los suelos agrícolas están afectados por las sales y en el territorio oriental se evidenció la mayor incidencia con 54,7%. Por esta razón, se consideró como problemática de riesgo potencial para la soberanía alimentaria en esta región (3).

Las plantas de importancia económica se consideran los organismos más estudiados, respecto a los efectos que producen las sales (4, 5). Sin embargo, escasos estudios logran documentar el impacto de este fenómeno sobre otros organismos con importancia agrícola, como por ejemplo los agentes de control microbiano utilizados para plagas que tienen su acción en el suelo, sustratos o la rizosfera. Estos biorreguladores no están exentos de riesgos, daños directos e incluso la posible pérdida de su efectividad biológica, debido a las sales.

Un estudio reciente demostró que las clamidosporas y conidios del hongo parásito facultativo de huevos de nematodos *P. chlamydosporia* lograron germinar al ser expuestos a altas concentraciones de NaCl (6). La cepa utilizada en dicho estudio, constituye el ingrediente activo de un bioproducto denominado KlamiC® (7, 8), efectivo para el biomanejo de nematodos formadores de agallas, considerados como una de las principales plagas de las hortalizas en Cuba (9, 10), por lo que se incrementó su demanda y con ello su producción y comercialización (11, 12).

El objetivo de esta investigación fue determinar los efectos de concentraciones de NaCl sobre el crecimiento micelial y la esporulación *P. chlamydosporia* en medio PDA y suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos ensayos en condiciones controladas en la Unidad de Investigación Desarrollo de Hongos Agentes de Control Biológico, perteneciente al Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA-Cuba).

Primer ensayo

Para ello, se preparó medio de cultivo microbiológico Papa Dextrosa Agar [PDA: 39 g (BioCen) por litro de agua destilada], el que se ajustó a las concentraciones de NaCl: 0, 40, 80, 120 y 160 mmol.L⁻¹, clasificadas como: no salina (0 mmol.L⁻¹), moderadamente salina (40-80 mmol.L⁻¹) y altamente salina (120 y 160 mmol.L⁻¹) (1).

De cada frasco que contenía las sales en medio PDA, se vertieron 20 ml en placas Petri (Ø 80 mm). Después de solidificado se procedió a ubicar en el centro de cada placa un disco (5 mm) de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (IMI SD 187), procedente del crecimiento masivo del hongo en medio PDA. Finalmente, las placas se sellaron con parafilm y se incubaron durante 21 días a temperatura constante de 25°C en la oscuridad.

Al cabo de este tiempo, se determinó el diámetro de las colonias (mm) mediante una regla milimetrada. También, se contabilizaron las clamidosporas por cada colonia, para ello se vertieron cinco ml de Tween (0,05%) esterilizado sobre el micelio del hongo en cada placa, el cual se dispersó cuidadosamente con una espátula de Drigalski hasta separar totalmente el micelio del agar y luego la suspensión obtenida se pasó a tubos de ensayo de 20 ml.

Finalmente, se contabilizaron las clamidosporas por cada colonia en cámara de Neubauer y microscopio óptico (ZEISS-AxioLab®, 100x).

A partir de los valores obtenidos del diámetro de las colonias, se procedió a calcular el área de las colonias $AC = \pi \cdot r^2$, donde, π : 3,14 y r^2 : radio al cuadrado, luego se calcularon los valores de esporulación por cada mm² de colonia. Por último, se obtuvo la inhibición de estas variables a través de la fórmula:

$$I = 100(\text{valor del control} - \text{valor del tratamiento salino}) / \text{valor del control}.$$

Segundo ensayo

El mismo se basó en la técnica *soil-membrane* (13, 14) que recientemente se empleó, con modificaciones, para determinar la receptividad a los suelos de aislamientos de *P. chlamydosporia* en Europa (15).

Para ello, se empleó un suelo agrícola del agrupamiento Fluvisol obtenido de la provincia Granma (Ca: 23,83 Cmol.kg⁻¹; Mg: 15,33 Cmol.kg⁻¹; P: 671,66 ppm; N: 2,16%; MO: 3,79%; pH: 7,73 y CE: 0,60 dS.m⁻¹), el mismo se homogenizó, tamizó (1 mm) y se esterilizó (autoclave, 30 min). Posteriormente, se prepararon en frascos de Erlenmeyer cuatro concentraciones de NaCl 40, 80, 120 y 160 mmol.L⁻¹ y un control.

Se adicionaron 20 g de suelo por cada placa Petri (\varnothing 80 mm), luego con una pipeta automática se añadió cuidadosamente la solución salina correspondiente sobre el suelo, hasta saturarlo de humedad totalmente. Sobre éste, se depositó una membrana de acetato de celulosa (tamaño del poro 0,2 μ). Finalmente, en el centro de la membrana se ubicó un disco (5 mm) de *P. chlamydosporia*, procedente de la periferia de una colonia joven, desarrollada en medio PDA. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron durante 21 días a temperatura constante de 25°C en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las membranas se retiraron cuidadosamente, se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar restos de suelo y por último se tificaron durante 12 h a temperatura ambiente con *cotton blue*.

Al cabo de este tiempo, nuevamente se enjuagaron con abundante agua destilada, luego se procedió a determinar el diámetro de cada una (mm), mediante una regla milimetrada, con estos valores se calculó el área de la colonia y se determinó la inhibición por efecto de las concentraciones de la sal, igual al ensayo anterior.

Finalmente, las membranas procedentes de cada tratamiento, se examinaron en microscopio óptico (ZEISS-AxioLab®, 200x), con el propósito de evidenciar la presencia de clamidosporas.

De esta manera, se estableció la abundancia cualitativa de las clamidosporas sobre las membranas. Para ello, se procedió a enfocar un campo visual, en el punto central que separa la distancia entre el sitio donde se estableció el disco de *P. chlamydosporia* y el borde periférico de cada colonia. Se clasificaron como: abundante (abundante cantidad de clamidosporas, agrupadas), poco abundante (menor abundancia de clamidosporas, menos agrupadas) y escasa (poca abundancia de clamidosporas, dispersas).

Diseño experimental y análisis estadístico

En ambos ensayos, cada una de las concentraciones de NaCl constituyó un tratamiento con cinco réplicas y un control, bajo un diseño completamente aleatorizado.

Los datos se procesaron mediante ANOVA unifactorial y los promedios se compararon con la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$), procesado con el paquete STATISTICA v.8.

Los ensayos se repitieron una vez en el tiempo, en ambos se alcanzaron valores similares y se usaron los promedios para expresar los resultados.

RESULTADOS

Primer ensayo

Se evidenciaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en las variables crecimiento micelial y esporulación de *P. chlamydosporia* en medio PDA (Tabla 1).

La menor inhibición del área de la colonia 6,55% se obtuvo con la concentración de 40 mmol.L⁻¹ de NaCl, le prosiguieron los tratamientos de 80 y 120 mmol.L⁻¹ que alcanzaron valores de 10,26% y 42,70%, respectivamente y la mayor inhibición 51,35% se cuantificó en el tratamiento de 160 mmol.L⁻¹ (Tabla 1).

El menor valor de inhibición en la producción de clamidosporas 21,57% se alcanzó con el tratamiento de 40 mmol.L⁻¹, seguido de los tratamientos 80 y 120 mmol.L⁻¹ que obtuvieron valores de 71,19% y 77,69%, respectivamente y la concentración que más afectó este proceso fue la de 160 mmol.L⁻¹ con un valor de 85,17% (Tabla 1).

TABLA 1. Efectos de las concentraciones de NaCl sobre la inhibición del crecimiento micelial y la esporulación de *P. chlamydosporia* en medio PDA./ *Effect of NaCl concentration on the inhibition of the mycelial growth and sporulation of P. chlamydosporia on PDA medium.*

Ttos. (mmol.L ⁻¹ de NaCl)	IAC (%)	IAC*	IPC (%)	IPC*
0	0,00	0,00 e	0,00	0,00 d
40	6,55	0,52 d	21,57	0,96 c
80	10,26	0,65 c	71,19	2,01 b
120	42,70	1,42 b	77,69	2,17 ba
160	51,35	1,60 a	85,17	2,37 a
CV	-	11,66	-	10,05

IAC: inhibición del área de la colonia, IPE: inhibición de la producción de clamidosporas, *transformación 2 arceseno ($\sqrt{x}/100$), CV: coeficiente de variación./ *IAC: inhibition of colony area, IPE: inhibition of chlamydospore production, *transformation 2 arceseno ($\sqrt{x}/100$), CV: coefficient of variation.*

Segundo ensayo

Se evidenciaron diferencias significativas ($p=0,05$) entre los tratamientos en la variable crecimiento micelial de *P. chlamydosporia* en condiciones de un suelo Fluvisol (Tabla 2).

TABLA 2. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre la inhibición del crecimiento micelial de *P. chlamydosporia* en un suelo Fluvisol./ *Effect of NaCl concentration on the inhibition of mycelial growth of P. chlamydosporia in Fluvisol soil.*

Ttos (mmol.L ⁻¹ de NaCl)	IAC (%)	IAC*
0	0,00	0,00 e
40	11,59	0,69 d
80	16,78	0,89 c
120	23,98	1,02 b
160	33,50	1,23 a
CV	-	13,57

IAC: inhibición del área de la colonia, *transformación 2 arceseno ($\sqrt{x}/100$), CV: coeficiente de variación./
IAC: inhibition of colony area, *transformation 2 arceseno ($\sqrt{x}/100$), CV: coefficient of variation.

La menor inhibición del área de la colonia se alcanzó en el tratamiento de 40 mmol.L⁻¹ de NaCl con un valor de 11,59%, proseguido en orden creciente de las concentraciones de 80 y 120 mmol.L⁻¹ con afectaciones de 16,78% y 23,98%, respectivamente y la mayor inhibición 33,50% se constató en la concentración de 160 mmol.L⁻¹ (Tabla 2).

En todas las concentraciones de NaCl utilizadas en condiciones de un suelo Fluvisol, el hongo logró producir clamidosporas sobre las membranas de acetato de celulosa, aunque al aumentar los contenidos de la sal, fue menos abundante la presencia de las mismas (Tabla 3, Figura). Este resultado posee vital importancia práctica, debido a que señala las potencialidades que tiene *P. chlamydosporia* de persistir y proliferar bajo los efectos de altas concentraciones de NaCl en un suelo de uso agrícola.

DISCUSIÓN

Los resultados evidenciaron que *P. chlamydosporia* persistió y produjo esporas en todas las concentraciones de NaCl evaluadas en el medio PDA y sobre el suelo Fluvisol y las mayores afectaciones se produjeron con el aumento de las concentraciones de NaCl. Donde, cuantitativamente, el proceso de esporulación fue más sensible a los efectos de la sal que el crecimiento micelial.

TABLA 3. Abundancia cualitativa de las clamidosporas de *P. chlamydosporia* bajo los efectos de las concentraciones de NaCl en un suelo Fluvisol./ *Qualitative abundance of chlamydozporas of P. chlamydosporia as affected by NaCl concentrations in conditions of Fluvisol soil.*

Ttos. (mmol.L ⁻¹ de NaCl)	Presencia de clamidosporas
0	Abundante
40	Abundante
80	Abundante
120	Poco abundante
160	Escasa

Todo ello sugiere que, de utilizarse al hongo *P. chlamydosporia* como alternativa para el biomanejo de *Meloidogyne* spp., en agroecosistemas con problemas de salinidad, se deberá usar inóculos que contengan además de las clamidosporas, otras estructuras fúngicas como fragmentos de hifas, los cuales potenciarán la proliferación del hongo y con ello se logrará un efectivo manejo de la plaga.

Por otra parte, se constató que la mayor concentración de Cloruro de Sodio afectó en menor proporción al crecimiento micelial del hongo cuando este creció en el suelo que cuando estuvo en el medio PDA, debido, probablemente, a que el suelo Fluvisol usado en el estudio presenta una adecuada estructura, textura, aireación y capacidad de intercambio catiónico (16), que relacionado con el pH (7,73) y el contenido de materia orgánica del mismo (3,79%), incidió en una adecuada nutrición, multiplicación y establecimiento del hongo, lo cual permitió menor inhibición de las variables fúngicas.

Al respecto, se constató que, en otro hongo agente de control biológico, *Trichoderma harzianum* Rifai, se produjo inhibición en la producción de masa micelial y la densidad de esporas en 18% y 96%, respectivamente, cuando fue expuesto a altas concentraciones de NaCl en un medio de cultivo líquido (17). Los resultados obtenidos en el estudio coincidieron con el informe publicado, donde se cuantificó una mayor inhibición en la producción de clamidosporas con respecto al crecimiento micelial.

Los resultados alcanzados por *P. chlamydosporia* en medio PDA, mostraron menores valores de inhibición de la esporulación, con respecto a lo informado sobre *T. harzianum* (17); destacándose de este modo, las potencialidades de *P. chlamydosporia* de persistir

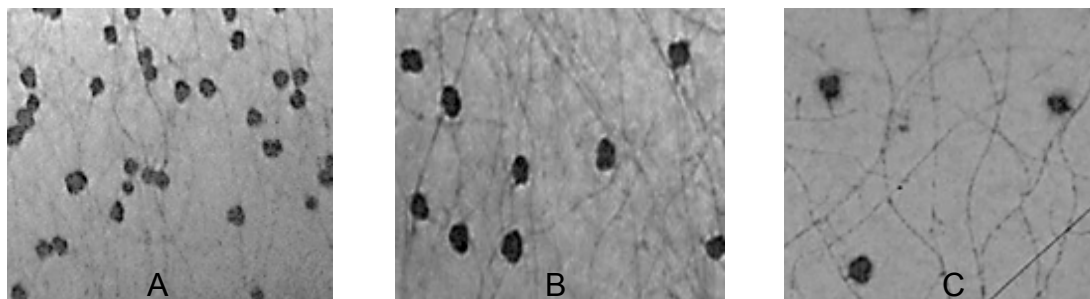


FIGURA. Abundancia de las clamidosporas de *P. chlamydosporia* en presencia de las concentraciones de NaCl sobre las membranas de acetato de celulosa en un suelo Fluvisol. Abundante (A), Poco abundante (B) y Escasa (C). Observadas a 200 aumentos, en el punto central que separa la distancia comprendida entre el sitio donde se estableció el disco de *P. chlamydosporia* y el borde periférico de cada colonia./ *Abundance of P. chlamydosporia chlamydozoospores as affected by NaCl concentrations on the cellulose acetate membranes in a Fluvisol soil. Abundant (A), Little abundant (B) and Scarce (C). Observed at 200 magnifications, in the focal point that separates the distance between the place where the P. chlamydosporia disk was set and the peripheral edge of each colony.*

y esporular bajo los efectos de altas concentraciones de NaCl, respecto a otras especies fúngicas.

En otro trabajo, donde se evaluaron mutantes de *T. harzianum* para el biomanejo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hans., en condiciones controladas, se obtuvieron valores de inhibición del crecimiento micelial y de la esporulación de 75% y 74%, respectivamente, a solamente 69 mmol.L⁻¹ de NaCl (18). Estos valores muestran una mayor inhibición de *T. harzianum* con respecto a la obtenida por *P. chlamydosporia*, el cual se sometió a mayores concentraciones de NaCl en medio PDA y suelo.

Por otra parte, en un informe reciente se sustentó que las clamidosporas de *P. chlamydosporia* son ligeramente menos sensibles que los conidios a las concentraciones de NaCl, las mismas se consideraron estructuras de resistencia (19) y de vital importancia para la adaptabilidad natural del hongo a las condiciones de estrés por salinidad (6).

Se conoce que la reducción en la absorción de sodio, la remoción de este elemento del citoplasma celular y la compartimentación del mismo en las vacuolas por inducción de una actividad enzimática *antiporter* Na⁺/H⁺, minimiza los efectos tóxicos de este elemento (20). El ajuste osmótico evita la deshidratación celular, de este modo se mantiene la presión de turgencia y las funciones celulares vitales (1). La síntesis de compuestos orgánicos de bajo peso molecular se asocia también a las respuestas frente al estrés por salinidad (21). Estos mecanismos, probablemente fueron utilizados por *P. chlamydosporia* para tolerar las concentraciones de NaCl evaluadas, aspecto que debe ser objeto de investigaciones futuras.

P. chlamydosporia persistió y proliferó en todas las concentraciones de NaCl usadas en medio PDA y suelo Fluvisol. Esta ventaja posibilitará la valoración de otros usos del hongo y con ello del bioproducto KlamiC®, como un candidato promisorio para el biomanejo de *Meloidogyne* spp., en agroecosistemas con problemas de salinidad.

Finalmente, la realización de otros estudios serán necesarios para evaluar la efectividad de *P. chlamydosporia* como agente de control microbiano de *Meloidogyne* spp., en presencia de concentraciones de NaCl y como posible mitigador de los efectos adversos que confieren las sales a las plantas de interés económico.

REFERENCIAS

1. Yadav S, Irfan M, Ahmad A, Hayat S. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. *J Environ Biol.* 2011;32:667-685.
2. FAO (Food and Agriculture Organization). Land and plant nutrition management service. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>. 2010; (consultado en agosto de 2012).
3. PMA (Programa Mundial de Alimentos). Análisis y cartografía de la vulnerabilidad a la seguridad alimentaria en Cuba. Publicación de la Representación del Programa Mundial de Alimentos en Cuba. 2001;38:19-20.
4. Tsegazeabe H, Berhane G. The Effect of Salinity (NaCl) on Germination of Selected Grass pea

- (*Lathyrus sativus* L.) Landraces of Tigray. Asian J Agric Sci. 2012;4(2):96-101.
5. Rezaee Z, Chehrazi M, Moalemi N. Effect of Salinity Stress on Seed Germination *Catharanthus roseus* Don. Cvs. Rosea and Alba. Asian J Agric Sci. 2012;4(2):117-121.
 6. Ceiro WG, Arévalo J, Puertas AL, Hidalgo-Díaz L. Tolerancia de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y W. Gams a diferentes niveles de cloruro de sodio. Rev Protección Veg. 2013;28(31):70-73.
 7. Hernández MA, Hidalgo-Díaz L. KlamiC®: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Rev Protección Veg. 2008;23(2):131-134.
 8. Montes de Oca N, Arévalo J, Nuñez A, Riverón Y, Villoch A, Hidalgo-Díaz L. KlamiC®: Experiencia técnica-productiva. Rev Protección Veg. 2009;24(1):2-4.
 9. Rodríguez MG, Gómez L, Cuadra R, Díaz-Viruliche L, Fernández E, Casanova A, et al. Nematodos formadores de agallas en sistemas de cultivos protegidos: Diagnóstico y manejo. Informe final de proyecto. Programa Ramal de Hortalizas-MINAG. (Inédito-Laboratorio de Nematología-CENSA, Cuba). 2006; p. 171.
 10. Gómez L, Rodríguez MG, Enrique R, Miranda I, González E. Factores limitantes de los rendimientos y calidad de las cosechas en la producción protegida de hortalizas en Cuba. Rev Protección Veg. 2009;24(2):117-122.
 11. Hidalgo-Díaz L, Kerry BR. Integration of biological control with other methods of nematode management. Ciancio A y Mukerji KG. (Eds). Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematode. 2008;p. 29-49.
 12. Manzanilla R, Esteves I, Finetti M, Hirsch P, Ward E, et al. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and Challenges to Improve Its Performance as a Biological Control Agent of Sedentary Endo-parasitic Nematodes. J Nematol. 2013;45(1):1-7.
 13. Grose MJ, Parker CA, Sivasithamparam K. Growth of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* in soil: effects of temperature and water potential. Soil Biol Biochem. 1984;16:211-216.
 14. Glenn OF, Parker CA, Sivasithamparam K. A technique to compare growth in soil of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* over a range of matric potentials. Parker CA, Rovira AD, Moore KJ, Wong PTW, Kollmorgen JF (Eds) Ecology and management of soilborne plant pathogens. The American Phytopathological Society, St. Paul. 1985; Pp. 24-26.
 15. Monfort E, Lopez-Llorca LV, Hans-Börje J, Salinas J. *In vitro* soil receptivity assays to egg-parasitic nematophagous fungi. Mycol Progress. 2006;5:18-23.
 16. Martín NJ, Durán JL. El suelo y su fertilidad. Ed. Félix Varela. La Habana, Cuba. 2011. Pp. 1-347.
 17. Regragui A, Lahlou H. Effect of salinity on *in vitro* *Trichoderma harzianum* antagonism against *Verticillium dahliae*. Pak J Biol Sci. 2005;8(6):872-876.
 18. Abdel-Latif HAM, Mohamed WH. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. Braz J Microb. 2006;37:181-191.
 19. Kerry BR, Hirsch PR. Ecology of *Pochonia chlamydosporia* in the Rhizosphere at the Population, Whole Organism and Molecular Scales (Chapter 7). Keith Davies and Yitzhak Spiegel (Eds.). Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms. Springer Dordrecht Heidelberg London New York Library of Congress Control Number: 2011928081. ©Springer Science+Business Media B.V. 201. Pp.171-182.
 20. Apse MP, Aharon GS, Snedden WS, Blumwald E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. Sci. 1999;285:1256-1258.
 21. Ghoulam C, Foursy A, Fares K. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. Environ Exp Bot. 2002;47:39-50.

Recibido: 8-7-2013.

Aceptado: 10-12-2013.